
MASTERARBEIT

Frau

B. Sc. Carolin Kökert

**Sequenzanalyse von
Legionellose
Schlüsselproteinen
verschiedener *Legionella*
Spezies**

Mittweida, 2013

MASTERARBEIT

Sequenzanalyse von Legionellose Schlüsselproteinen verschiedener *Legionella* Spezies

Autor:

Frau B. Sc. Carolin Kökert

Studiengang:

Molekularbiologie/ Bioinformatik

Seminargruppe:

MO11w1-M

Erstprüfer:

Dipl. Biologe Heiko Schulze

Zweitprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde

Einreichung:

Mittweida, 23.08.2013

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 29.08.2013

Faculty Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

MASTER THESIS

Sequence analysis of legionellosis key proteins of various *Legionella* species

author:

Ms. B. Sc. Carolin Kökert

course of studies:

Molekularbiologie/ Bioinformatik

seminar group:

MO11w1-M

first examiner:

Dipl. Biologe Heiko Schulze

second examiner:

Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde

submission:

Mittweida, 23.08.2013

defence/evaluation:

Mittweida, 29.08.2013

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Betreuern Dipl. Biol. Heiko Schulze und Prof. Dr. Dirk Labudde ohne deren Unterstützung und Entgegenkommen meine Arbeit wahrscheinlich nicht zustande gekommen wäre. Ein herzlicher Dank geht an das gesamte Team der Südsachsen Wasser GmbH für eine jederzeit freundliche Zusammenarbeit und die außerordentlich fürsorgliche Aufnahme in die Firma. Insbesondere möchte ich Kerstin, Nicole, Annett und Katrin, sowie Ronny, für die methodische Einarbeitung und die stetige fachliche und persönliche Unterstützung danken.

Ein spezieller Dank geht an alle Kommilitoninnen und Kommilitonen für die gegenseitige Hilfe und die zahlreichen Unterhaltungen über weite Ferne.

Meiner Familie, meinem Freund und all meinen lieben Freunden danke ich für ihre Geduld und Zusprache, mit der sie mir stets zur Seite standen und mich oftmals aufgemuntert haben.

„Education's purpose is to replace an empty mind with

an open one”

Malcolm Forbes

Bibliografische Beschreibung:

Kökert, Carolin:

Sequenzanalyse von Legionellose Schlüsselproteinen verschiedener *Legionella* Spezies. – 2013. - IX, 90, XIV S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Masterarbeit, 2013

Referat:

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Sequenzanalyse der für die Legionellose relevanten Schlüsselproteine der Organismen *Legionella anisa*, *Legionella drancourtii* und *Legionella shakespearei*, sowie mit *in vitro*-Kultivierungsexperimenten der Spezies *Legionella pneumophila* ATCC 33152. Zunächst wurden die gesetzlichen Gegebenheiten der Legionellenproblematik und die biologischen Hintergründe betrachtet, darunter die intrazellulären Mechanismen der Legionellose. Die Ergebnisse der Arbeit beinhalten Informationen über die Schlüsselproteine der drei Legionellen Spezies und deren mögliche Pathogenität.

Abstract:

This thesis gives attention to the sequence analysis of legionellosis relevant key proteins of the organisms *Legionella anisa*, *Legionella drancourtii* and *Legionella shakespearei*, as well as to the experiments of *in vitro* cultivation of the species *Legionella pneumophila* ATCC 33152. Initially the legitimate circumstances of the complex of problems with *Legionella species* and the biological background, especially the intracellular mechanisms of legionellosis, were viewed. The results of the master thesis contain information about the key proteins and possible pathogenicity of the three considered *Legionella species*.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Zielsetzung	2
1.3 Kapitelübersicht	2
2 Grundlagen.....	3
2.1 Gesetzliche Grundlagen und Vorschriften.....	3
2.1.1 Trinkwasserverordnung 2001.....	3
2.1.2 Empfehlung des Umweltbundesamtes.....	4
2.1.3 DVGW-Arbeitsblatt W 551	5
2.2 Biologische Grundlagen.....	8
2.2.1 <i>Legionella species</i>	8
2.2.1.1 Referenzstamm <i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia 1	12
2.2.1.2 <i>Legionella longbeachaea</i>	13
2.2.1.3 <i>Legionella anisa</i>	14
2.2.1.4 <i>Legionella drancourtii</i>	14
2.2.1.5 <i>Legionella shakespearei</i>	16
2.2.2 Legionellose.....	16
2.2.2.1 Infektion	16
2.2.2.2 Intrazelluläre Prozesse	18
2.2.3 Schlüsselproteine	19
2.3 Bioinformatische Grundlagen.....	27
2.3.1 Genomsequenzierung.....	27
2.3.2 Genomasmblierung.....	28
2.3.3 Genomannotation	29
2.3.4 Sequenzalignments	30
3 Material und Methoden.....	33
3.1 Material.....	33

3.1.1	Daten	33
3.1.2	Softwares.....	34
3.1.3	Labormaterialien für die Legionellen Kultivierung	35
3.2	Methoden.....	37
3.2.1	<i>in vitro</i> -Kultivierung von Legionellen.....	37
3.2.2	GeneMark	40
3.2.3	BASys.....	43
3.2.4	BLASTP	47
3.2.5	ClustalW	47
3.2.6	Mega 5.....	48
4	Ergebnisse	49
4.1	<i>in vitro</i> -Kultivierung von Legionellen.....	49
4.2	GeneMark	51
4.3	BASys.....	53
4.4	BLASTP	55
4.5	Mega 5 mit ClustalW	61
5	Auswertung und Diskussion.....	67
5.1	<i>in vitro</i> -Kultivierung von Legionellen.....	67
5.2	Sequenzanalyse der Schlüsselprotein	68
6	Ausblick.....	77
	Glossar.....	79
	Literatur	83
	Anlagen	A
	Teil 1	A
	Teil 2	I
	Teil 3	J
	Inhaltsangabe der CD-ROM	M
	Selbstständigkeitserklärung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskop-Aufnahme von Legionellen	9
Abbildung 2: <i>Legionella pneumophila</i> Kolonien	13
Abbildung 3: Transmissionselektronenmikroskopaufnahme von <i>Legionella drancourtii</i> in Vakuolen von <i>Amoebae polyphaga</i>	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Legionelleneindringung im Lungenbläschen.....	17
Abbildung 5: Infektionszyklus von Legionellen im Makrophagen	19
Abbildung 6: Schematische Darstellung der molekularen Prozesse der Legionellose	20
Abbildung 7: Proteine der Wirtszellinvasion.....	21
Abbildung 8: Proteine für die Vakuolenneugestaltung	23
Abbildung 9: Proteine für das Überleben der Wirtszelle und intrazelluläre Replikation.. ..	24
Abbildung 10: Proteine für das intrazelluläre Legionellenwachstum und den Wirtszellentod.....	25
Abbildung 11: 3D-Struktur des Homodimers MIP	26
Abbildung 12: Verlaufsschema – Von der genomischen DNA zur rekonstruierten Genomsequenz.....	28
Abbildung 13: Scaffolding.....	29
Abbildung 14: Wasserbad mit Zirkulation	38
Abbildung 15: Darstellung der Vorgehensweise von GeneMarkS.....	42
Abbildung 16: Schematische Darstellung des BASys Aufbaus	45
Abbildung 17: ClustalW Parameter in der Software Mega 5	48
Abbildung 18: Ergebnisse der Kultivierungsversuche	50
Abbildung 19: Überprüfung der isolierten Kolonien auf Bi-Plates.....	51
Abbildung 20: Auszug aus der durch GeneMark erzeugten Gentabelle für <i>L. anisa</i>	52
Abbildung 21: BASys Genomkarte für <i>Legionella anisa str. Linanisette</i>	54
Abbildung 22: Auszug der Genomkarte von <i>Legionella anisa str. Linanisette</i>	54

Abbildung 23: Auszug des Multiplen Sequenzalignments von SdhA und LpnE	65
Abbildung 24: Veränderte Situation bei der Wirtszellinvasion	72
Abbildung 25: Veränderte Situation bei der Vakuolenneugestaltung.....	74
Abbildung 26: Auswirkungen auf die Apoptose und das intrazelluläre Wachstum.....	75
Abbildung 27: Veränderung bei der Replikation und dem Wirtszelltod.....	76
Abbildung 28: Legionellose-Pathway von <i>Legionella anisa</i>	J
Abbildung 29: Legionellose-Pathway von <i>Legionella drancourtii</i>	K
Abbildung 30: Legionellose-Pathway von <i>Legionella shakespearei</i>	L

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bewertung der Befunde bei einer orientierenden Untersuchung	6
Tabelle 2: Bewertung der Befunde bei einer weitergehenden Untersuchung.....	7
Tabelle 3: Bestätigte <i>Legionella</i> Spezies	11
Tabelle 4: Genomsequenzdaten.....	33
Tabelle 5: Verwendete Softwares	34
Tabelle 6: Ansätze der Kultivierungsversuche	38
Tabelle 7: Ergebnisse der Kultivierungsversuche	49
Tabelle 8: Zusammenfassung der GeneMark Ergebnisse	52
Tabelle 9: BLASTP Ergebnisse	56
Tabelle 10: Details der BLASTP Ergebnisse	57
Tabelle 11: Details der BLASTP Ergebnisse	58
Tabelle 12: BLASTP – identifizierte Proteine	59
Tabelle 13: Phylogenetische Bäume einiger Schlüsselproteine	62
Tabelle 14: BLASTP Ergebnisse von <i>L. pneumophila</i> Philadelphia 1	69
Tabelle 15: Zusammenfassung der BLASTP Ergebnisse	71
Tabelle 16: Von BASys bestimmte Genfunktionen	I

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
+p	Phosphorylierung
+u	Ubiquitinierung
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
A	Adenin
Apaf-1	Apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor 1
ASC	“Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD”
BASys	Bacterial Annotation System
Bcl-rambo	Apoptose Unterstützer
BLAST(P)	Basic Local Alignment Search Tool (Protein)
BLOSUM	Blocks Substitution Matrix
BNIP3	Adenovirus E1B 19kDa Interaktionsprotein 3
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C3b	complement component 3
ca.	zirka
CASP	Caspase
CD	Cluster of differentiation
CD-ROM	Compact Disc Read-Only Memory
Clk1	CDC-like kinase 1
CytC	Cytochrom C
DB	Datenbank
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DVGW	Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V
E-Wert	Erwartungswert
eEF1A	eukaryontischer Elongationsfaktor 1A
EN	Europäische Norm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
G	Guanin
Hbs1	Elongationsfaktor 1 alpha-like Protein
hmm	Hidden Markov Model
Homodeller	generiert 3D Proteinstrukturen
HSF1	Hitzeschock Transkriptionsfaktor 1
Hsp70	Hitzeschock 70 kiloDalton Protein
ID	Identifikation
IE	Internationale Einheiten
IkB	NF-kappa-B Inhibitor alpha
IL	Interleukin
IPAF	NLR family CARD domain-containing protein 4
ISO	Internationale Organisation für Standardisierung
K	Kelvin
KBE	koloniebildende Einheit
l	Liter
<i>L. spec.</i>	<i>Legionella species</i>
Mega 5	Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5
ml	Milliliter
MyD88	myeloid differentiation primary response 88
Naip5	NLR Familie, Apoptose Inhibitor Protein
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-kB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1

PDB	Protein Datenbank des "Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)"
Pfam	Protein Familien Datenbank
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-phosphate
PROSITE	Datenbank für Protein Domänen, Familien und funktionelle Stellen
PSIPRED	Tool zur Generierung der Sekundärstruktur eines Proteins
str.	strain (Stamm)
subsp.	subspecies = Unterart
T	Thymin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Necrosis Faktor
u.a.	und andere
u.ä.	und ähnliche
UBA	Umweltbundesamt
UniProt	Universal Protein Database
VADAR	Volume, Area, Dihedral Angle Reporter

1 Einleitung

1.1 Motivation

Den aktuellsten Veröffentlichungen vom 27. Juni 2013 des Robert Koch Instituts (RKI) zufolge wurden 2012 in Deutschland 655 Fälle von Legionärskrankheit (Legionellen-Pneumonie (Lungenentzündung) oder auch Legionellose) registriert [RKI: INFEKTIONSEPIDEMIOLOGISCHES JAHRBUCH, 2012]. Die im Jahre 1976 entdeckte Erkrankung, die durch die Inhalation von Legionellen-enthaltenden Aerosolen in die menschliche Lunge hervorgerufen wird, ist seit Januar 2001 in der Bundesrepublik meldepflichtig. Nicht zuletzt auf Grund der Änderung der Trinkwasserverordnung im November 2011, bei der die Untersuchung von Großanlagen zur Trinkwassererwärmung auf Legionellen auch für Unternehmer und sonstige Inhaber zur gesetzlichen Pflicht wurde, rückte die Legionellose erneut ins Rampenlicht. Doch steht dieser Untersuchungsaufwand im realistischen Verhältnis zur Gefährlichkeit der Erkrankung? Trotz der Meldepflicht geht das RKI von einer erheblichen Untererfassung der Legionärskrankheit aus. Schätzungen des Kompetenznetzwerkes für ambulant erworbene Pneumonien (CAPNETZ) besagen, dass fast 4% der ambulant auftretenden Pneumonien in Deutschland durch Legionellen verursacht werden. Dies würde bedeuten, dass geschätzte 15.000 bis 30.000 Fälle der Legionellose jährlich auftreten, während nur ca. 600 davon gemeldet werden. Schlussfolgernd kommt es in Deutschland bei einer Sterberate von 10-15% aller Legionelloseerkrankten schätzungsweise zu ähnlich vielen Todesfällen wie durch Verkehrsunfälle registriert werden (in den vergangenen vier Jahren im Durchschnitt 3852 Menschen pro Jahr) [STATISTISCHES BUNDESAMT, 2013]. Aus diesem Grund sollte die Legionärskrankheit, ihr Verlauf, die Entstehung und der Verursacher nicht unterschätzt sondern weiter erforscht und verstanden werden. [RKI: LEGIONÄRSKRANKHEIT, 2011]

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Masterarbeit ist es, die Spezies *Legionella anisa*, *Legionella drancourtii* und *Legionella shakespearei*, welche bis dato nicht intensiv erforscht sind, auf wichtige Schlüsselproteine der Legionellose zu untersuchen. Dabei sollen bioinformatische Tools genutzt werden, um die drei *Legionella* Spezies bestmöglich mit der Referenzspezies *Legionella pneumophila* zu vergleichen. Anschließend gilt es, aus den gewonnenen Erkenntnissen mit Hilfe der KEGG Pathway Karte der Legionellose auf Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf zu schließen. Neben diesem Kernstück der Arbeit, in dem es letztlich um die Einschätzung der Pathogenität der drei *Legionella* Spezies geht, sollen auch *in vitro* Kultivierungsversuche zu den Ergebnissen zählen.

1.3 Kapitelübersicht

Die Masterarbeit besteht aus sechs Kapiteln.

Nach der im **ersten Kapitel** erfolgten allgemeinen Einleitung, werden in **Kapitel 2** die gesetzlichen Grundlagen und die für die Masterarbeit relevanten biologischen und bioinformatischen Grundthemen erläutert.

Im sich anschließenden **Kapitel 3** werden die verwendeten Materialien und die angewandten Methoden vorgestellt. Schwerpunkt sind dabei die genutzten bioinformatischen Methoden.

Im **Kapitel 4** werden die Ergebnisse der einzelnen in Kapitel 3 aufgeführten Methoden dargestellt.

Danach erfolgt in **Kapitel 5** die Auswertung der Ergebnisse. Die Resultate der Masterarbeit werden zusammengefasst und diskutiert.

Schließlich wird im **Kapitel 6** ein Ausblick auf eine mögliche Fortführung des Masterprojektes gegeben.

2 Grundlagen

In diesem Kapitel wird auf die, für die Masterarbeit relevanten, theoretischen Grundlagen eingegangen. Diese beinhalten neben gesetzlichen Vorschriften die biologischen und bioinformatischen Grundthemen.

2.1 Gesetzliche Grundlagen und Vorschriften

Das Infektionsschutzgesetz (IfSG) regelt seit Januar 2001 die gesetzlichen Pflichten zur Vermeidung und Beseitigung von Infektionskrankheiten beim Menschen. Dazu zählt auch, dafür Sorge zu tragen, dass durch das Trinkwasser keine Krankheitserreger in einer zu hohen Konzentration verbreitet werden, welche zu einer Schädigung der menschlichen Gesundheit führen könnte. Der Abschnitt *Wasser* des IfSG enthält die Ermächtigung zum Erlass von entsprechenden Rechtsvorschriften, wie beispielsweise der Trinkwasserverordnung. [INFEKTIONSSCHUTZGESETZ, 2011]

Für die laborpraktische Arbeit mit Legionellen sind besonders die geänderte Trinkwasserverordnung 2001 (TrinkwV 2001) sowie das DVGW-Arbeitsblatt W 551 „Trinkwassererwärmungs- und Trinkwasserleitungsanlagen; Technische Maßnahmen zur Verminderung des Legionellenwachstums; Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasser-Installationen“ von Bedeutung, welche im Folgenden erläutert werden.

2.1.1 Trinkwasserverordnung 2001

Trinkwasser gilt als das wichtigste Lebensmittel, welches zudem unersetzbar ist. Gemäß der vom Deutschen Institut für Normung e.V. herausgegebenen Norm DIN 2000 soll Trinkwasser bei der Übergabe an den Verbraucher appetitlich sein und zum Genuss anregen. Es soll farblos, kühl, geruchlos und geschmacklich einwandfrei sein.

Noch viel bedeutender ist dabei die Forderung nach einem keimarmen Trinkwasser, welches frei von Krankheitserregern ist und keine gesundheitsschädlichen Eigenschaften besitzt. [WASSERLEXIKON: DIN 2000]

Die für die Trinkwasserkontrolle vorgegebenen Methoden und Maßnahmewerte für die Legionellenuntersuchung sind durch die Trinkwasserverordnung gesetzlich geregelt. Die neueste Fassung vom 05.12.2012 der Trinkwasserverordnung bestimmt für *Legionella species* (*L. spec.*) einen technischen Maßnahmewert von 100/100 ml. Jedem Unternehmer oder sonstigen Eigentümer einer Trinkwasser-Installation, in der sich eine Großanlage zur Trinkwassererwärmung befindet, wird eine jährliche Kontrolle auf Legionellen vorgeschrieben, bei gewerblicher Nutzung nur aller drei Jahre. Dabei handelt es sich um Anlagen, welche Trinkwasser im Rahmen einer gewerblichen oder öffentlichen Tätigkeit abgeben und Duschen oder ähnliche Einrichtungen enthalten, durch die es zu einer Vernebelung des Wassers kommen kann. Der Ablauf der Probenahme und –untersuchung sowie die Bewertung der Ergebnisse sind im DVGW-Arbeitsblatt W 551 festgelegt und unterliegen den Empfehlungen des Umweltbundesamtes (UBA). Die Trinkwasserverordnung legt für die Untersuchung auf *Legionella spec.* die Methoden ISO 11731 sowie DIN EN ISO 11731 Teil 2 fest, ebenfalls unter Berücksichtigung von eventuell vorliegenden UBA Empfehlungen. [TRINKWV 2001]

2.1.2 Empfehlung des Umweltbundesamtes

Die Empfehlung des UBA „Systemische Untersuchungen von Trinkwasser-Installationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung“ vom 23. August 2012 ist eine Überarbeitung der Fassung vom Jahr 2000 und richtet sich sowohl an Inhaber von Trinkwassererwärmungsanlagen als auch an Labore, Probennehmer und Mitarbeiter von Gesundheitsämtern um die Vorgaben der Trinkwasserverordnung exakt umzusetzen. Die Empfehlung befindet sich im Anlagen Teil 1 der Arbeit.

2.1.3 DVGW-Arbeitsblatt W 551

Das Arbeitsblatt W 551 des Deutschen Vereins des Gas- und Wasserfaches e.V. beschreibt den ordnungsgemäßen Betrieb von Trinkwasser-Installationen zur Verhinderung einer massenhaften Vermehrung von Legionellen im Warmwassersystem bzw. deren Abtötung bei Vorhandensein. Die neueste Fassung von 2004 aktualisiert und fasst die Arbeitsblätter W 551 und W 552 von 1993 und 1996 zusammen. [DVGW-ARBEITSBLATT W 551, 2004]

Das DVGW-Arbeitsblatt W 551 besagt, dass alle Trinkwasser-Installationen in öffentlich und privat genutzten Gebäuden die folgenden Vorschriften zu erfüllen haben:

- der Speicher-Trinkwassererwärmer muss über ausreichend große Reinigungs- und Wartungsöffnungen verfügen
- am Warmwasseraustritt des Trinkwassererwärmers muss bei bestimmungsgemäßem Betrieb eine Temperatur von $\geq 60^{\circ}\text{C}$ eingehalten werden können
- Konstruktion des Kaltwassereinlaufs des Trinkwassererwärmers so, dass bei der Entnahme eine große Mischzone vermieden wird
- bei größeren Behältern mit mehr als 400 l Speichervolumen müssen durch Konstruktion und andere Maßnahmen (z.B.: Umwälzung) sichergestellt werden, dass das Wasser an allen Stellen gleichmäßig erwärmt wird
- in Großanlagen sowie in Kleinanlagen mit Rohrleitungen >3 Liter zwischen Abgang Trinkwassererwärmer und Entnahmestelle sind Zirkulationssysteme einzubauen
- Zirkulationsleitungen und -pumpen sind so zu bemessen, dass im zirkulierenden Warmwassersystem die Warmwassertemperatur um nicht mehr als 5 K gegenüber der Speicheraustrittstemperatur unterschritten wird

Werden diese Regeln eingehalten, so kann ein Legionellenwachstum im Trinkwassererwärmer ausgeschlossen bzw. verhindert werden. Besonders das Einhalten der geforderten Temperaturen ist von großer Bedeutung. Es garantiert das Absterben von eventuell in das System eingetragenen Legionellen. Des Weiteren ist der Betrieb der Zirkulationspumpe elementar um ein Aufkeimen von Legionellen zu verhindern. Das zirkulierende Wasser sorgt für einen guten Temperatenausgleich und

damit geringe Temperaturabnahmen im System und verhindert die Bildung von problematischen Biofilmen, ein Absetzen von organischen und anorganischen Partikeln im System. Biofilme gewähren den Legionellen einen hervorragenden Platz zur Vermehrung und bieten besonderen Schutz vor Desinfektionsmitteln.

Bei allen Trinkwassererwärmungssystemen muss eine systemische Untersuchung durchgeführt werden. Dabei muss neben dem Vorlauf (am Austritt des Trinkwassererwärmers) und der Zirkulation (am Eintritt in den Erwärmer) auch jeder Steigstrang eines Systems beprobt werden. Müssen auf Grund von erhöhten Legionellenzahlen Nachproben genommen werden, kann es je nach Größe, Ausdehnung und Verzweigung des Systems zu deutlich mehr geforderten Probenahmestellen kommen. Die Bewertung der im Labor erhaltenen Ergebnisse erfolgt nach den Tabellen 1 und 2 für die orientierende und die weitergehende Untersuchung. [DVGW-ARBEITSBLATT W 551, 2004]

Tabelle 1: Bewertung der Befunde bei einer orientierenden Untersuchung
[DVGW-ARBEITSBLATT W 551, 2004]

Legionellen (KBE/100 ml)¹⁾	Bewertung	Maßnahme	weitergehende Untersuchung	Nachunter- suchung
>10000	extrem hohe Kontamination	direkte Gefahrenabwehr erforderlich (Desinfektion und Nutzungs- einschränkung, z.B. Duschverbot) Sanierung erforderlich	unverzüglich	1 Woche nach Desinfektion bzw. Sanierung
>1000	hohe Konta- mination	Sanierungserfordernis ist abhängig vom Ergebnis der weitergehenden Untersuchung	umgehend	-
≥ 100	mittlere Konta- mination	keine	innerhalb von 4 Wochen	-
<100	keine/geringe Kontamination	keine	keine	nach 1 Jahr (nach 3 J.) ²⁾

1) KBE = koloniebildende Einheiten

2) Werden bei 2 Nachuntersuchungen im jährlichen Abstand weniger als 100 Legionellen in 100 ml nachgewiesen, kann das Untersuchungsintervall auf maximal 3 Jahre ausgedehnt werden.

**Tabelle 2: Bewertung der Befunde bei einer weitergehenden Untersuchung
[DVGW-ARBEITSBLATT W 551, 2004]**

Legionellen (KBE/100 ml)¹⁾	Bewertung	Maßnahme	weitergehende Untersuchung	Nachunter- suchung
>10000	extrem hohe Kontamination	direkte Gefahrenabwehr erforderlich (Desinfektion und Nutzungseinschränkung, z.B. Duschverbot) Sanierung erforderlich	unverzüglich	1 Woche nach Desinfektion bzw. Sanierung
>1000	hohe Kontamination	kurzfristige Sanierung erforderlich	innerhalb von max. 3 Monaten	1 Woche nach Desinfektion bzw. Sanierung ²⁾
≥ 100	mittlere Kontamination	mittelfristige Sanierung erforderlich	innerhalb von max. 1 Jahr	1 Woche nach Desinfektion bzw. Sanierung ²⁾
<100	keine/geringe Kontamination	keine	keine	nach 1 Jahr (nach 3 Jahren) ³⁾

- 1) KBE = koloniebildende Einheiten
- 2) Werden bei 2 Nachuntersuchungen in vierteljährlichem Abstand weniger als 100 Legionellen in 100 ml nachgewiesen, braucht die nächste Nachuntersuchung erst nach einem 1 Jahr nach der 2. Nachuntersuchung vorgenommen zu werden. Diese Nachuntersuchungen können entsprechend dem Schema der orientierenden Untersuchung (Tabelle 1) durchgeführt werden.
- 3) Werden bei Nachuntersuchungen im jährlichen Abstand weniger als 100 Legionellen in 100 ml nachgewiesen, kann das Untersuchungsintervall auf maximal 3 Jahre ausgedehnt werden.

Bei der Trinkwasseruntersuchung auf Legionellen ist zu beachten, dass es keine Grenzwerte gibt, wie beispielsweise bei *Escherichia coli*. Hingegen spricht man bei den Legionellen von einem technischen Maßnahmewert. Dieser induziert, wie der Name schon sagt, bestimmte Maßnahmen, die in der Folge der Überschreitung eines bestimmten Wertes ausgeführt werden müssen (siehe Tabellen 1 und 2).

2.2 Biologische Grundlagen

Dieser Abschnitt soll die Grundlagen der für die Masterarbeit relevanten biologischen Sachverhalte erläutern. Nach einer Einführung zu den verschiedenen Legionellen Spezies, um die es sich in der Arbeit handelt, soll besonders auf die Legionellose und ihre Schlüsselproteine eingegangen werden.

2.2.1 *Legionella species*

Die Gattung der *Legionella* gehört zur Familie der *Legionellaceae* und zählt aktuell 58 Spezies [NCBI:TAXONOMY BROWSER, 2013] mit mindestens 79 Serogruppen. Es ist davon auszugehen, dass alle *Legionella species* als potenziell humanpathogen einzustufen sind. [RKI: LEGIONELLOSE, 2013] 1976 erkrankten bei einem Treffen amerikanischer Legionäre in Philadelphia 182 der 4000 Teilnehmer an einer schweren Pneumonie. Nachdem 29 von ihnen verstarben, wurde fieberhaft nach der Ursache der in diesem Hotel ausgebrochenen Epidemie gesucht. Erst im Januar 1977 konnte der Erreger aus dem Lungengewebe eines der verstorbenen Veteranen isoliert werden. Ursache für diesen verhältnismäßig späten Fund ist die Tatsache, dass sich die Bakterien aufgrund ihrer Zellwand nur sehr schwach gramnegativ anfärben lassen, sodass sie in den Lungenbiopsiepräparaten nicht nachweisbar waren. Mittels Silberimprägnierung konnten die Legionellen schließlich dennoch als Bakterien identifiziert werden. Erstmals wurde die Gattung durch Brenner 1979 wissenschaftlich beschrieben [BRENNER ET AL., 1979]. Für eine leichtere Identifikation wurden in den folgenden Jahren geeignete Kultivierungsmedien und serologische Nachweisverfahren entwickelt. [SCHREFF, SCHINDLER, 2013]

Bei den Legionellen handelt es sich um stäbchenförmige, begeißelte, gramnegative Bakterien mit einer durchschnittlichen Länge von 2 – 5 µm und einer Breite von 0,3 – 0,9 µm (Abbildung 1). Die obligat aerob lebenden Mikroorganismen kommen in Süßwässern ubiquitär vor, wurden aber bereits auch aus der Erde isoliert. Neben dem Vorkommen in natürlichen Oberflächengewässern findet man die Legionellen auch in, vom Menschen erschafften, aquatischen Biotopen wie Warmwasserleitungen, Whirlpools, Rückkühlwerke, Befeuchtern, Klimaanlage, u.ä. Während sie auch im kalten Wasser überleben können, erreichen die Legionellen in diesen erwärmten

Gewässern ihr Wachstumsoptimum, welches bei etwa 35°C – 42°C liegt. [STANKE, 2005; PLEISCHL, 2013] Über die genauen Temperaturbereiche, in denen Legionellen überleben können, gibt es geteilte Meinungen. FIELDS (2002) beschreibt beispielsweise eine Vermehrung in einem Temperaturbereich von 25°C bis 45°C mit einem Optimum bei 35°C. In anderen Quellen sind Spannweiten von 30°C bis 50°C und das Temperaturoptimum bei 37°C angegeben. Um ein Abtöten der Legionellen zu garantieren, müssen Temperaturen von mindestens 60°C herrschen. Zu einem langsamen Absterben kommt es aber bereits schon ab 55°C. [BEHLING, 2004]

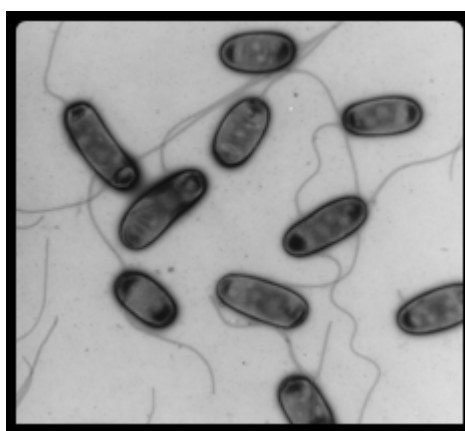


Abbildung 1: Elektronenmikroskop-Aufnahme von Legionellen

In der Abbildung deutlich zu erkennen, sind die Stäbchenform sowie die Begeißelung der Legionellen. [RKI BERLIN, 2011]

Legionellen besitzen eine Verdopplungsrate von etwa zwei Stunden [PLEISCHL, 2013]. Sie sind zwar in der Lage im Trinkwasser mehrere Monate zu überleben, doch benötigen sie für das Wachstum scheinbar Wirtszellen wie Amöben oder andere Protozoen [ROWBOTHAM, 1980; STEINERT ET AL., 1997]. Diese finden sie vor allem in Biofilmen, welche sich durch Ablagerungen in wässrigen Systemen bilden. Sie begünstigen die Vermehrung der Legionellen durch den erhöhten Schutz vor Umwelteinflüssen. Der Biofilm und die darin beherbergten Wirtszellen schützen die Legionellen also doppelt vor großen Temperatur- und Säuregradschwankungen, bioziden Substanzen oder gewöhnlichen Trinkwasseraufbereitungsmaßnahmen, was ihre Überlebenschancen deutlich erhöht. In den Wirtszellen besiedeln die Stäbchenbakterien Zysten, in denen sie sich mittels spezieller intrazellulärer Prozesse vermehren. Dieselbe Technik kommt auch bei der Besiedelung der Alveolarmakrophagen der menschlichen Lunge zum Einsatz. Nachdem die Legionellen

über Inhalation keimhaltiger Aerosole in den Respirationstrakt aufgenommen wurden, können sie je nach Pathogenität und ausgebildeten Virulenzfaktoren zwei verschiedene Krankheitsverläufe hervorrufen. [FLIEGER ET AL., 2003]

Bei der Legionellose ohne Pneumonie, dem Pontiac-Fieber handelt es sich um eine Erkrankung mit grippeähnlichen Symptomen. Nach einer Inkubationszeit von 5-66 Stunden können Abgeschlagenheit, Muskelschmerzen, Husten, Fieber und Kopf- und Gliederschmerzen auftreten. Das Pontiac-Fieber klingt nach wenigen Tagen von allein und ohne medikamentöse Behandlung wieder ab. Jährlich treten in Deutschland schätzungsweise 100.000 Infektionen mit Pontiac-Fieber auf [SCHREFF, SCHINDLER, 2013]. Wesentlich seltener, mit einer geschätzten Dunkelziffer von etwa 15.000 bis 30.000 Fällen, tritt die Legionärskrankheit, also die Legionellose mit Pneumonie, auf. Mit einer deutlich längeren Inkubationszeit von 2 bis 10 Tagen (durchschnittlich 6-7 Tage) kann die Legionellenpneumonie sowohl mit Husten und Fieber aber auch mit beatmungspflichtiger Pneumonie und Multiorganversagen einhergehen. Aus diesem Grund liegt die Letalität bei dieser Form der Erkrankung bei 10-15% [RKI: LEGIONÄRSKRANKHEIT 2011]. Unbehandelte Fälle oder falsch- bzw. nichtdiagnostizierte Legionellenpneumonien, und damit verbunden die Behandlung mit falschen Antibiotika, können zum Tod führen. [BEHLING, 2004]

Seit der Isolierung der ersten Legionellen Spezies 1977, deren Name sich aus *Legionella*, zu Ehren der amerikanischen Legionäre, und *pneumophila* (griech. „die Lunge liebend“) zusammensetzt, wurden zahlreiche weitere *Legionella species* entdeckt. 1985 wurden im *Legionella Criteria Document* 22 Spezies der Art aufgeführt. 1999 waren es bereits 42, von denen 7 in Serogruppen eingeteilt werden konnten (Tabelle 3). Aktuell gehören zum Genus *Legionella* 53 Spezies [NCBI:TAXONOMY BROWSER, 2013] mit mindestens 79 Serogruppen, Tendenz steigend [RKI: LEGIONELLOSE, 2013]. Allerdings werden häufig, so auch im *Legionella Criteria Document* von 1999, die ebenfalls zur Familie der *Legionellaceae* gehörenden Gattungen *Fluoribacter* mit drei und *Tatlockia* mit zwei Spezies als Legionellen hinzugezählt. So ergibt sich eine Gesamtzahl von aktuell 58 bekannten *Legionella species*. [NCBI:TAXONOMY BROWSER, 2013] Bakterienstämme einer Spezies, die sich in Serogruppen einteilen lassen, sind genetisch homolog, können aber durch spezifische Antikörperreaktionen von einander unterschieden werden [EPA, 1985]. Auch wenn alle *Legionella species* als potenziell pathogen gelten, konnten bisher noch nicht alle mit Legionellosepatienten in Verbindung gebracht werden. BANGSBORG veröffentlichte 1997 eine Liste, in der 24 der bis dato 42 bekannten Legionellen

Spezies bereits als nachweislich pathogen gekennzeichnet wurden (Tabelle 3). 18 von ihnen konnten mit Pneumonienpatienten assoziiert werden. [EPA, 1999]

Tabelle 3: Bestätigte *Legionella* Spezies [modifiziert nach BANGSBORG, 1997]

Name	In Verbindung gebracht mit Legionellose?	Name	In Verbindung gebracht mit Legionellose?
<i>Candidatus L. jeonii</i>	Nein	<i>L. lansingensis</i>	Ja
<i>L. adalaidensis</i>	Nein	<i>L. londiniensis</i> SG 1-2	Nein
<i>L. anisa</i>	Ja	<i>L. longbeachae</i> SG 1-2	Ja
<i>L. beliardensis</i>	Nein ¹	<i>L. lytica</i> *	Ja
<i>L. birminghamensis</i>	Ja	<i>L. maceachernii</i> (<i>Tatlockia maceachernii</i>)	Ja
<i>L. bozemanii</i> * (<i>Fluoribacter bozemaniae</i>) SG 1-2	Ja	<i>L. micdadei</i> * (<i>Tatlockia micdadei</i>)	Ja
<i>L. brunensis</i>	Nein	<i>L. monrovica</i>	Nein
<i>L. busanensis</i>	Nein ¹	<i>L. moravica</i>	Nein
<i>L. cherrii</i>	Ja	<i>L. nagasakiensis</i>	Ja ²
<i>L. cincinnatiensis</i>	Ja	<i>L. nautarum</i>	Nein
<i>L. donaldsonii</i>	Nein ¹	<i>L. oakridgensis</i> *	Ja
<i>L. drancourtii</i>	Nein ¹	<i>L. parisiensis</i> (Lo Presti et al. 1997)	Ja
<i>L. dresdenensis</i>	Nein ¹	<i>L. pneumophila</i> * SG 1-16	Ja
<i>L. drozanskii</i>	Nein ¹	<i>L. quateirensis</i>	Nein
<i>L. dumoffii</i> * (<i>Fluoribacter dumoffii</i>)	Ja	<i>L. quinlivanii</i> SG 1-16	Ja
<i>L. erythra</i>	Nein	<i>L. rowbothamii</i>	Nein ¹
<i>L. fairfieldensis</i>	Nein	<i>L. rubrilucens</i>	Nein
<i>L. fallonii</i>	Nein ¹	<i>L. sainthelensi</i> SG 1-2	Ja
<i>L. feeleyi</i> * SG 1-2	Ja**	<i>L. santacrucis</i>	Ja
<i>L. geestiana</i>	Nein	<i>L. shakespearei</i>	Nein
<i>L. genomospecies 1</i>	Nein ¹	<i>L. spiritensis</i>	Nein

Name	In Verbindung gebracht mit Legionellose?	Name	In Verbindung gebracht mit Legionellose?
<i>L. gormanii</i> * (Fluoribacter gormanii)	Ja	<i>L. steelei</i>	Nein ¹
<i>L. gratiana</i>	Ja	<i>L. steigerwaltii</i>	Nein
<i>L. gresilensis</i>	Nein ¹	<i>L. taurinensis</i>	Nein ¹
<i>L. hackeliae</i> * SG 1 -2	Ja	<i>L. tucsonensis</i>	Ja
<i>L. impletisoli</i>	Nein ¹	<i>L. wadsworthii</i>	Ja
<i>L. israelensis</i>	Nein	<i>L. waltersii</i>	Nein
<i>L. jamestowniensis</i>	Nein	<i>L. worsleiensis</i>	Nein
<i>L. jordanis</i>	Ja	<i>L. yabuuchiae</i>	Nein ¹

SG = Serogruppe

* = Spezies mit experimentell dokumentierter Fähigkeit Amöben zu parasitieren (aus Originaltabelle von BANGSBORG, 1997)

** = Spezies verursacht Pontiac-Fieber, aber selten Pneumonie [LO PRESTI ET AL., 1998] (aus Originaltabelle von BANGSBORG, 1997)

L. species = ergänzt aus NCBI: TAXONOMY BROWSER (Stand 10.07.2013)

¹ = Information über Pathogenität aus [MINISTRY OF HEALTH, 2011]

² = Information über Pathogenität aus [YANG ET AL., 2012]

Im Folgenden soll nun Augenmerk auf die Spezies *Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1* (auch: *L. pneumophila Philadelphia 1*), *Legionella longbeachae*, *Legionella anisa*, *Legionella drancourtii* und *Legionella shakespearei* gelegt werden.

2.2.1.1 Referenzstamm *Legionella pneumophila Philadelphia 1*

Bei dem Stamm *Legionella pneumophila Philadelphia 1* bzw. wie in NCBI vermerkt als *Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1* unter der Taxonomy ID 272624 handelt es sich um den Originalstamm, der 1976 den Legionelloseausbruch in Philadelphia auslöste. Die Spezies *Legionella pneumophila* ist für etwa 90% aller Legionellose-Erkrankungen verantwortlich, allein 82% werden nur von der Serogruppe

1 ausgelöst [PLEISCHL, 2004]. Das Isolat von 1976 besteht aus einem einzelnen zirkulären Chromosom, welches 3.397.754 Basenpaare (bp) [GENBANK AE017354] mit einem GC-Gehalt von 38% besitzt. [NCBI: L.P. PHIL.]

Wie Abbildung 2 zeigt, wachsen *Legionella pneumophila* Kolonien auf GVPC-Selektivagar (Erläuterung siehe 3.1.3 Labormaterialien) uhrglasförmig, mit weiß bis grüner Färbung und bilden ein braunes Melanin-ähnliches Pigment. Unter langwelligem UV-Licht bei 366 nm fluoresziert der Stamm, wie alle seiner Spezies *L. pneumophila*, nicht, während andere Legionellen Spezies blau-weiß autofluoreszieren.

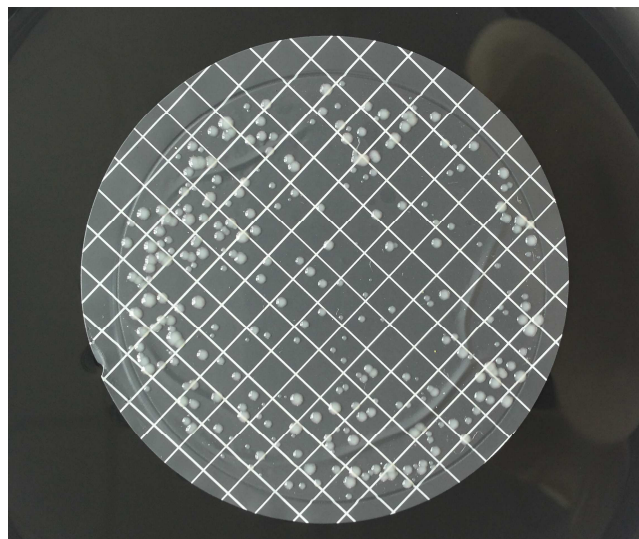


Abbildung 2: *Legionella pneumophila* Kolonien

Die Abbildung zeigt auf einem 0,45 µm Cellulose-Nitrat-Filter, der auf GVPC-Agar inkubiert wurde, gewachsene *L. pneumophila* Kolonien.

Der Stamm *Legionella pneumophila* Philadelphia 1 soll als Referenzstamm für die Spezies *Legionella pneumophila* dienen.

2.2.1.2 *Legionella longbeachaea*

Die Spezies *L. longbeachaea* ist nach *L. pneumophila* zweithäufigster Verursacher der Legionärskrankheit. Hauptsächlich Serogruppe 1 der zwei vorhandenen Serogruppen in dieser Spezies löst in Australien und Neuseeland fast 50% aller Legionellose Fälle aus [YU ET AL., 2002].

2.2.1.3 *Legionella anisa*

Legionella anisa wurde erstmals zwischen März 1980 und Juni 1981 aus Trinkwasser isoliert. Der Stamm konnte während Ausbrüchen von nosokomialer Legionellose, das heißt im Zuge eines Krankenhausaufenthalts erworbene Legionellose, aus Trinkwasserproben von Krankenhäusern in Chicago und Los Angeles angezüchtet werden. Die Stämme zeigten *Legionella species* typische biochemische Reaktionen. Es waren gramnegative Stäbchen, welche Cystein zum Wachstum benötigten und Katalase positiv, Urease negativ, Nitrat negativ, Hippurat negativ und nicht fermentativ waren. Ebenso waren sie positiv für Oxidase und Beta-Laktamase und produzierten ein braunes, diffusionsfähiges Pigment. Zudem zeigte *Legionella anisa* eine blau-weiße Autofluoreszenz unter langwelligem UV-Licht. [GORMAN ET AL., 1984]

1989 wurde der erste Fall von Legionärskrankheit im Zusammenhang mit *Legionella anisa* registriert. Der 31 jähriger Mann konnte, nach erfolgreicher Erkennung der Erkrankung durch *Legionella anisa* mittels Antikörper, durch die Behandlung mit dem Antibiotikum Erythromycin innerhalb von wenigen Tagen geheilt werden. [FALLON, STACK, 1990]

Obwohl *Legionella anisa* eher selten bei Erkrankungen detektiert wird, konnte die Spezies 2009 bei einem Patienten mit einem Kultur-negativen mykotischen Aneurysma entdeckt werden. Da die Erreger von solchen sehr seltenen Aneurysmen praktisch nie Pilze, sondern Bakterien sind, wurde das Blut und betroffenes Gewebe des 79-jährigen Patienten mittels *broad-range* PCR auf bakterielle 16S rRNA Gene untersucht. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden sequenziert und mit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ein Abgleich mit bekannten Bakteriengensequenzen durchgeführt. Mit einer Ähnlichkeit von $\geq 98\%$ handelte es sich im Blut des Patienten um *L. anisa*, was durch eine anschließende Analyse des MIP (macrophage inhibitor potentiator) Gens bestätigt wurde. Da keine anderen Erreger detektiert werden konnten, wurde *L. anisa* als Verursacher des Aneurysmas identifiziert. Die Ansteckungsquelle konnte nicht ausfindig gemacht werden. Dieser Fall zeigt die Pathogenität des Bakteriums, welche sich untypisch in einem mykotischen Aneurysma und nicht in einer Pneumonie äußerte. [TANABE ET AL., 2009]

2.2.1.4 *Legionella drancourtii*

2004 wurde ein bis dato LLAP12 (*Legionella*-like amoebal pathogen) genannte Spezies aufgrund ihrer Eigenschaften in *Legionella drancourtii* umbenannt. Phylogenetische

Analysen der 16S rRNA und des Gens MIP ergaben eine Verwandtschaft der Spezies mit *Legionella lytica* und *Legionella rowbothamiae*. Dennoch ergaben serologische Tests und die sequenz-basierten Analysen, dass es sich bei *Legionella drancourtii* um eine eigenständige Spezies handelt. Die Transmissionselektronenmikroskopanalyse ergab, dass es sich bei *L. drancourtii* um ein polymorphes, gramnegatives Bakterium handelt, welches in der Lage ist sich in zytoplasmatischen Vakuolen innerhalb von Amöben zu vermehren (siehe Abbildung 3). [LA SCOLA ET AL., 2004]

Legionella drancourtii ist bisher bezüglich humaner Erkrankungen nicht in Erscheinung getreten [MINISTRY OF HEALTH, 2011]. Es kann allerdings dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Legionellen Spezies in der Lage ist Legionellose zu verursachen.

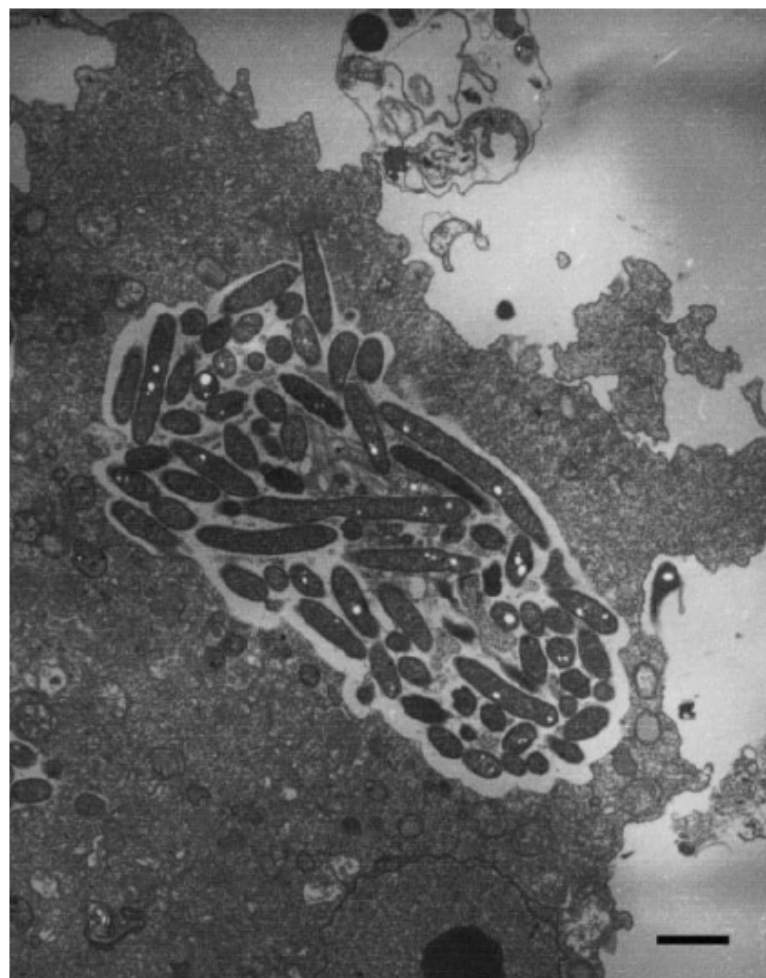


Abbildung 3: Transmissionselektronenmikroskopaufnahme von *Legionella drancourtii* in Vakuolen von *Amoebae polyphaga*.

(Balken entspricht 1 µm) [LA SCOLA ET AL., 2004]

2.2.1.5 *Legionella shakespearei*

Die Spezies *Legionella shakespearei* wurde 1992 erstmals in der Literatur erwähnt. Der Stamm wurde aus einem Kühlturm in Stratford-upon-Avon in England isoliert. *L. shakespearei* bildet auf BCYE (buffered charcoal-yeast extract)-Agar leicht pinke, nicht fluoreszierende Kolonien. VERMA ET AL. bestätigte die neue Legionellen Spezies mittels DNA Hybridisierungsstudien. Diese ergaben ebenfalls eine nur 8%ige Verwandtschaft der DNA zwischen *L. shakespearei* und *L. pneumophila* Philadelphia 1 bei 60°C. Die Speziesbeschreibung charakterisiert *L. shakespearei* als Oxidase-positives, Katalase-positives, β -Lactamase-positives, Gelatinase-positives, gramnegatives Bakterium, welches ein einzelnes polares Flagellum besitzt. [VERMA et al., 1992]

2.2.2 Legionellose

Wie unter 2.2.1 *Legionella species* bereits erwähnt, können Legionellen zwei verschiedene Verlaufsformen der Legionellose verursachen. Diese können neben weltweit meist sporadisch registrierten Einzelfällen auch in epidemischen Ausbrüchen auftreten. So zum Beispiel 1999 auf einer Blumenschau in den Niederlanden [DEN BOER ET AL., 1999] oder 2010 im Stadtgebiet von Ulm und Neu-Ulm, wo es über 60 Erkrankte gab. Hier war der Auslöser ein kontaminiertes Nassrückkühlwerk einer Großklimaanlage [VON BAUM ET AL., 2012]. Bei der milden Form der Legionellose, dem Pontiac-Fieber, besteht keine Meldepflicht, da diese Erkrankung meist nicht von einem herkömmlichen grippalen Infekt zu unterscheiden ist. Aus diesem Grund soll im weiteren Verlauf besonderes Augenmerk auf die Legionellenpneumonie gelegt werden, welche etwa 22,5% aller ambulant erworbenen und bis zu 40% aller nosokomialen Pneumonien ausmacht [FANG ET AL., 1990].

2.2.2.1 Infektion

Durch die Zerstäubung von Wasser, welche zum Beispiel beim Duschen oder in Klimaanlagen vorkommt, entstehen feinste Tröpfchen. Diese können Legionellen enthalten und durch ihre Größe von 2-5 μm tief in die Lunge eindringen [BEHLING, 2004]. Ob es nach der Inhalation der Bakterien zu einer Erkrankung kommt, hängt von der Quantität der eingeatmeten Legionellen, ihrer Spezies und Assoziation mit Amöben und natürlich vom Immunstatus des Wirtes ab. In den Lungenbläschen werden die Legionellen von sogenannten Alveolarmakrophagen phagozytiert (Abb. 4). [BRIELAND

ET AL., 1997; PEDRO-BOTET ET AL., 1998] Diese befinden sich auf der Lungenbläschenoberfläche und sind für die Phagozytose von totem Material, Toxinen aus dem Blut sowie Fremdpartikeln zuständig. Nachdem ein Alveolarmakrophage ein Partikel aufgenommen hat, wandert die Zelle in die Lungenbläschen ein. [KORTSIK, 2002]

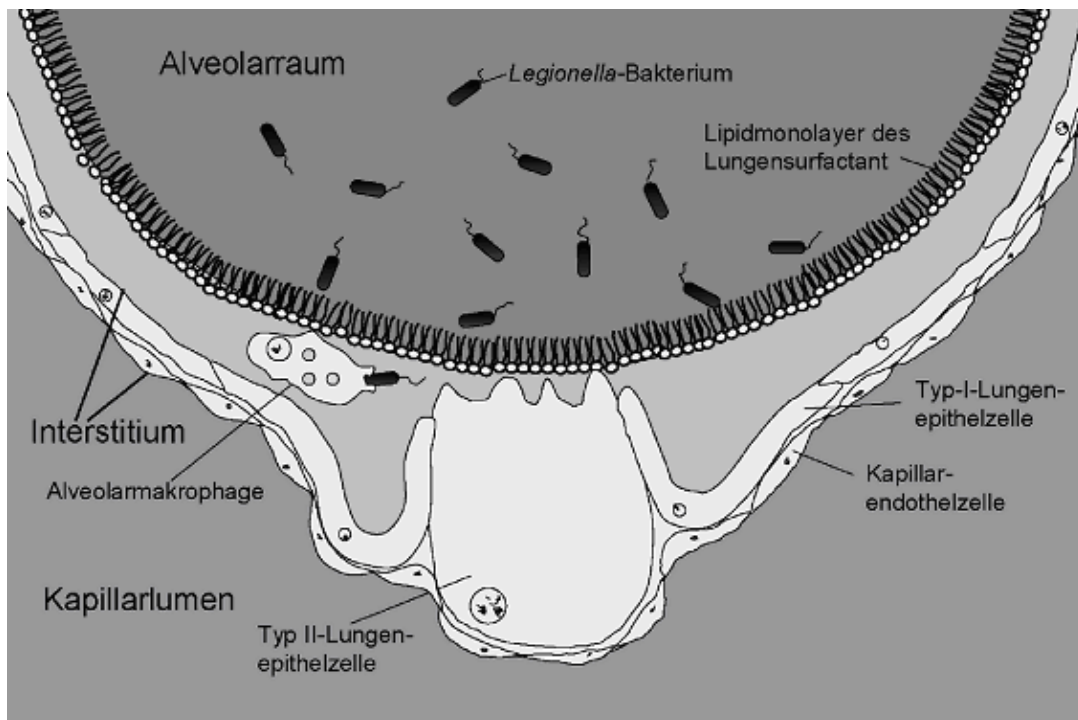


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Legionelleneindringung im Lungenbläschen

Die Abbildung zeigt das Verhalten der Legionellen nach der Aspiration legionellenhaltiger Aerosole in die Lungenbläschen. Die Legionellen werden von Alveolarmakrophagen aufgenommen und vermehren sich dort intrazellulär bis zur Lyse der Makrophagen. Ein Befall weiterer Wirtszellen, wie beispielsweise auch Typ-I (flache Alveolarepithelzellen)- und Typ-II (kubische Alveolarepithelzellen)-Pneumozyten, ist möglich. Das Lungenepithel wird direkt, durch die Infektion mit Legionellen, und indirekt durch die Freisetzung von hydrolytischen Enzymen bakteriellen und eukaryonten Ursprungs nach Wirtszelllyse zerstört. Dadurch kann die Dichtheit des alveolären Epithels gefährdet werden und eine Verstopfung der Lungenbläschen zur Folge haben. Hinzu kommt die mögliche Schädigung der Lipidmonoschicht des Lungensurfactantfilms, der für die Lungenfunktion unabdingbar ist. [FLIEGER ET AL., 2003]

2.2.2.2 Intrazelluläre Prozesse

In den Makrophagen beginnt die untypische Biogenese der Legionellen-enthaltenden Vakuole (*Legionella*-containing vacuole, kurz: LCV). Dabei verhindern bzw. verzögern die Legionellen die normalerweise stattfindende Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (*Oxidativer Burst*), welche für die intrazelluläre Verdauung der phagozytierten Fremdkörper von großer Bedeutung ist, und die Interaktion mit dem endosomalen Netzwerk, was eine Ansäuerung des Phagosoms sowie die Verschmelzung mit Lysosomen und damit den Abbau der meisten Mikroorganismen zur Folge hat (Abb. 5). Nach wenigen Minuten fusionieren die LCV's mit den Mitochondrien der Wirtszelle und beginnen mit der Rekrutierung von Vesikeln des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Innerhalb der nächsten Stunden kommt es zur Vermehrung der Legionellen in den Vakuolen, dessen Membran rauen Endoplasmatischen Retikulum ähnelt. Die Phagosomen werden nun angesäuert und die Verschmelzung mit Lysosomen findet statt. Füllt eine LCV fast den gesamten Alveolarmakrophagen aus und sind die lokalen Nährstoffreserven nahezu verbraucht, verwandeln sich die Bakterien in ihre virulente Form. Diese kennzeichnet sich zum Beispiel durch Motilität durch Flagellenexpression oder Zytotoxizität. Die Wirtszellen werden anschließend lysiert und die Legionellen können im extrazellulären Raum neue Infektionszyklen beginnen bei denen auch alveoläre Epithelzellen betroffen sein können (siehe Abb. 4). [FLIEGER ET AL., 2003; NEWTON et al., 2010]

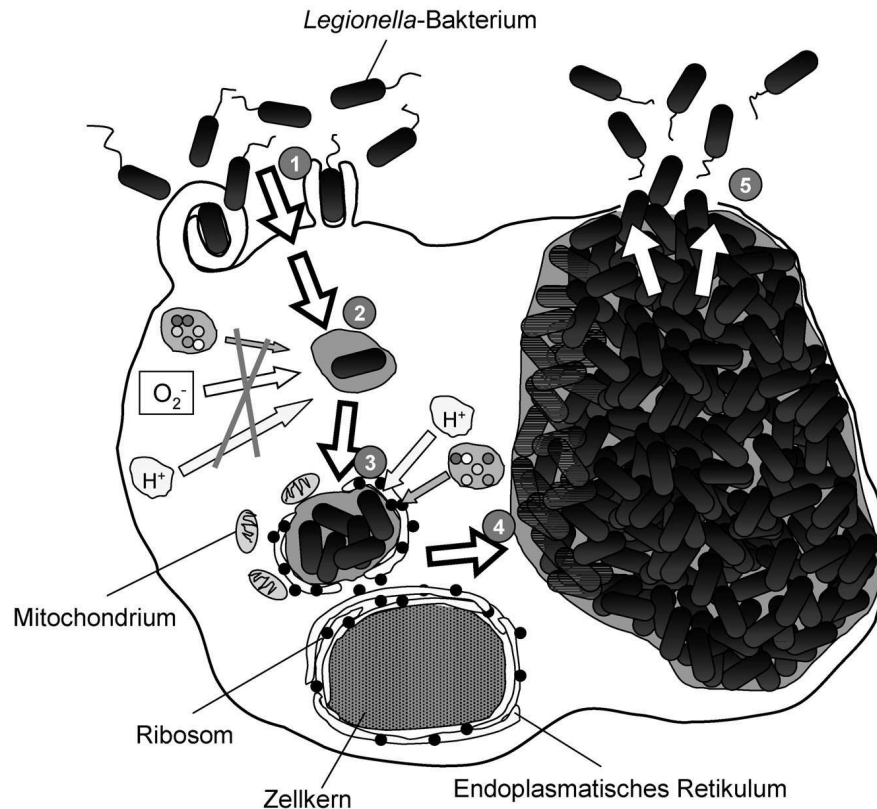


Abbildung 5: Infektionszyklus von Legionellen im Makrophagen

- ① Eintritt der Legionellen in die Alveolarmakrophagen.
- ② Blockierung des Oxidativen Burst, der Ansäuerung der LCV und der Fusionierung der LCV mit Lysosomen.
- ③ Anlagerung von Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum der Wirtszelle an die LCV. Intrazelluläre Vermehrung der Legionellen mit Ansäuerung des Phagosoms und dessen Verschmelzung mit Lysosomen.
- ④ LCV's wachsen bis sie fast die komplette Wirtszelle ausfüllen.
- ⑤ Sind keine Nährstoffe mehr vorhanden, wandeln sich die Legionellen in ihre virulente Form um. Die Phagosomen und Wirtszellmembran wird lysiert und die Bakterien können im extrazellulären Raum neue Wirtszellen befallen. [FLIEGER ET AL., 2003]

2.2.3 Schlüsselproteine

Die Schlüsselproteine der Legionellose sind die wichtigsten von *Legionella species* exprimierten Proteine, welche in den Lungenbläschen und intrazellulär in den Makrophagen Prozesse aktivieren, deaktivieren oder beeinflussen. Sie sorgen für die Aufnahme der Bakterien in die Alveolarmakrophagen und manipulieren den Wirtszelltod und die Überlebens-Pathways so, dass ihre intrazelluläre Vermehrung weiterhin möglich ist. Zu den Schlüsselproteinen zählen die in der Legionellose Karte der KEGG Database aufgeführten, rot markierten Proteine (siehe Abb. 6). Diese gehören zum Typ IV Sekretionssystem Dot/Icm, welches für die Fähigkeit der



KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011]

Nach Inhalation der Legionellen bis hin zu den Lungenbläschen sind zunächst die fünf Proteine **RtxA**, **EnhC**, **LpnE**, **LvhB2** und **HtpB** in die Wirtszelleninvasion involviert (Abb. 7). Allerdings konnte bisher nicht für alle fünf Proteine gezeigt werden, dass sie definitiv eine direkte Rolle für die Bakterienzelle spielen. [WEBER ET AL., 2009]

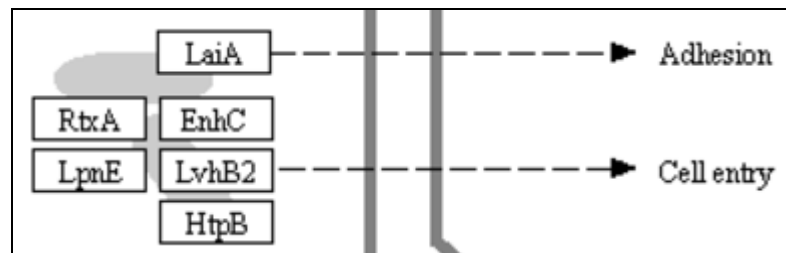


Abbildung 7: Proteine der Wirtszellinvasion

Dargestellt ist die Anheftung des Legionellen Adhäsionsproteins LaiA an die Wirtszelle sowie der Zelleintritt der Legionellen Proteine RtxA, EnhC, LpnE, LvhB2 und HtpB. [KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011]

Das „repeats in structural toxin“ (RTX) Gen **rtxA** von *L. pneumophila* konnte als bedeutend für den Eintritt und die Replikation in Alveolarmakrophagen sowie in dem Amöbenvertreter *Acanthamoeba castellanii* identifiziert werden. **rtxA** ist außerdem in intrazelluläre Überlebens- und Trafficking-Mechanismen involviert. CIRILLO ET AL. fanden 2001 heraus, dass eine spezifische Inaktivierung des Gens zu einem messbaren Verlust der Virulenz der Bakterien in Mäusen führt. [CIRILLO ET AL., 2002] Dennoch scheint das Nichtvorhandensein von **rtxA** der Pathogenität der Legionellen keinen Abbruch zu tun, denn auch *Legionella longbeachae* besitzt das Gen nicht und ist dennoch in der Lage eine Legionellose auszulösen [BIBB ET AL., 1981].

enhC kodiert für ein periplasmatisches Protein, welches für die Erhaltung der Zellwandintaktheit benötigt wird. Aus diesem Grund ist dessen Beitrag für den Wirtszellbefall wahrscheinlich indirekt. [WEBER ET AL., 2009]

htpB, das Chaperonin groEL, ist das bestcharakterisierte Protein der fünf Zelleintrittsproteine. Ähnlich wie **lpnE**, welches bei der Vermeidung der Endosomfusion mitwirkt und für den effizienten Zelleintritt benötigt wird, spielt **htpB** eine duale, vermutlich verlinkende, Rolle im bakteriellen Zelleintritt und der frühen Entwicklung der LCV. Zusätzlich wirkt es bei der Rekrutierung der Mitochondrien mit. [WEBER ET AL., 2009]

Die Expression des Gens ***lvhB2*** verbessert die Effizienz der Legionelleninfektion von Säugetierzellen. *lvhB2*-Mutanten zeigten allerdings keinen deutlichen Defekt bei der Interaktion mit den Wirtszellen bei Versuchen bei 37°C, aber es hat einen ca. 100-fachen Effekt auf den Zelleintritt und die intrazelluläre Replikation bei 30°C. Das lässt eine hohe Bedeutung von *lvhB2* für die Effizienz der Wirtszelleninfektion bei niedrigeren Temperaturen gewachsenen Legionellen vermuten. [RIDENOUR, 2003]

laiA kodiert für ein Adhäsionsmolekül (siehe Abb. 7), welches ebenfalls in die Virulenz und die Übertragung von *Legionella pneumophila* involviert ist. Experimente von CHANG ET AL. (2005) ergaben, dass *laiA*-Mutanten aus den Lungen eliminiert wurden und eine verringerte Mortalität im Vergleich zu *laiA*-Wildtypen verursachten. [CHANG ET AL., 2005]

Für die Biogenese der LCV ist ebenfalls das Dot/Icm Typ IV Sekretionssystem und Effektorproteine, von denen sich einige über Phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P) der Wirtszelle an der LCV Membran verankern. ***vipA***, ***vipD***, und ***vipE*** inhibieren die Fusion mit Lysosomen und stören und verhindern damit die Entsorgung von Proteinen in der Vakuole (Abb. 8). [SHOHDY ET AL., 2005] ***ralF***, ***drdA/sidM***, ***lidA***, ***sidC*** und ***sidA*** sind für die Rekrutierung der Wirts GTPase Arf1, Rab1 und weiteren Endoplasmatischen Retikulum Vesikeln verantwortlich. Würde diese Rekrutierung nicht stattfinden, so bedeutet die Abwesenheit dieser Wirtszellenbestandteile eine Verminderung der intrazellulären Replikation in der veränderten, neugestalteten Vakuole. [WEBER ET AL., 2009]

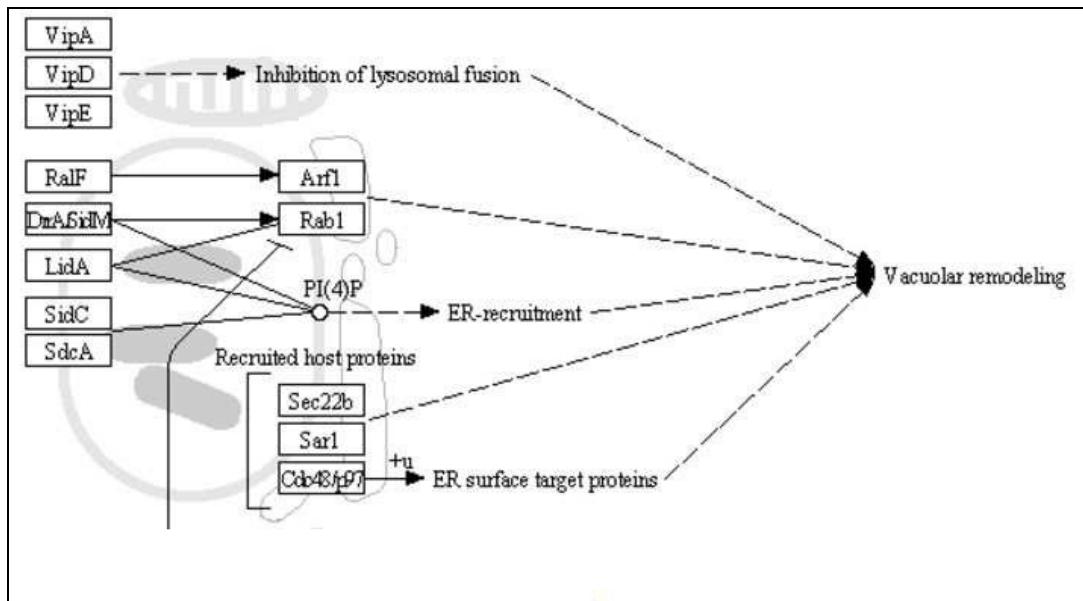


Abbildung 8: Proteine für die Vakuolenneugestaltung

Im Schema dargestellt sind die intrazellulären Vorgänge, welche zur Umgestaltung und Veränderung der Vakuole führen. Dazu zählen die Inhibierung der Lysosomenfusion und die Rekrutierung bestimmter Wirtszellbestandteile. [KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011]

Abbildung 9 zeigt, dass ***sdhA*** die Caspase-abhängigen oder –unabhängigen Pathways inhibiert, welche die Apoptose auslösen. Dies geschieht entweder direkt oder aber indirekt durch einen Effekt auf die Mitochondrien. Ist ***sdhA*** vorhanden so wird also der Wirtszelltod verhindert. [LAGUNA ET AL., 2006] Dieselbe Funktion haben die Dot/Icm Effektoren ***sidF***, ***legK1*** und ***sdbA***, welche gemeinsam den programmierten Zelltod der Wirtszelle, der normalerweise durch das Eindringen der Bakterien ausgelöst wird, verhindern. ***lubX*** wird nach der Infektion exprimiert und größtenteils in die Wirtszellen entlassen. Dort inhibiert es die Clk Kinase, was zu einer Reduktion des Legionellenwachstums in den Makrophagen führt. [KUBORI ET AL., 2008]

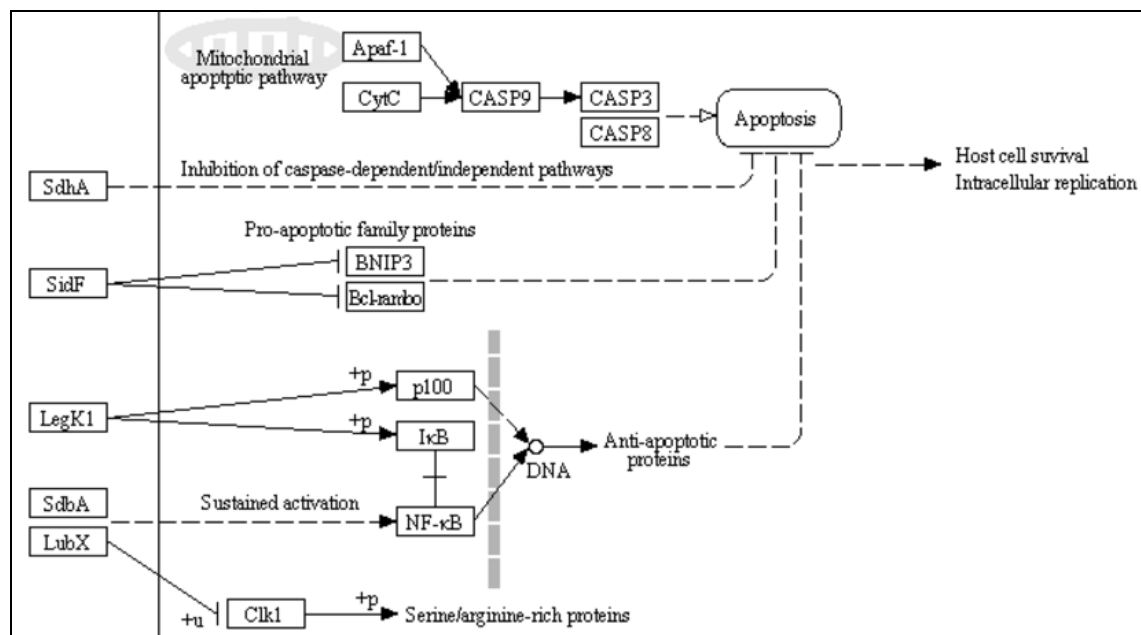


Abbildung 9: Proteine für das Überleben der Wirtszelle und intrazelluläre Replikation

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der intrazellulären Mechanismen der Legionellen in der Wirtszelle für die Umgehung der Wirtszellapoptose und damit der intrazellulären Vermehrung der Bakterien in den Lungenzellen. [KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011]

In Abbildung 10 sind die Proteine und Mechanismen für das Legionellenwachstum und den Wirtszellentod dargestellt. **Igt1/2/3** sind drei homologe Glukosyltransferasen, welche unter anderem Serin 53 des menschlichen Elongationsfaktor 1A modifizieren, was zur Inhibierung von Proteinen und damit zum Zelltod führt [BELYI ET AL., 2012]. Auf die gleiche Weise wirkt das Genprodukt des Gens **sidI**. Auch **lepA** und **lepB** sind Effektoren des Dot/Icm Sekretionssystems. Die beiden Proteine sind höchstwahrscheinlich speziesspezifisch und sind in die nicht-lytische Freisetzung der Legionellen aus den Wirtszellen involviert. **lepB** ist außerdem in der Lage Rab1 zu inhibieren. **flaA** kodiert für das Flagellin, welches bei der Umwandlung der Legionellen in ihre virulente Form zum Einsatz kommt. Es verursacht den Wirtszelltod und wird außerhalb der Makrophagen, genauso wie die Lipopolysaccharide (LPS) der Legionellen, durch den *Toll-ähnlichen Rezeptor* erkannt, welcher eine Struktur des angeborenen Abwehrsystems ist. Durch die Signaltransduktion wird eine Immunantwort ausgelöst.

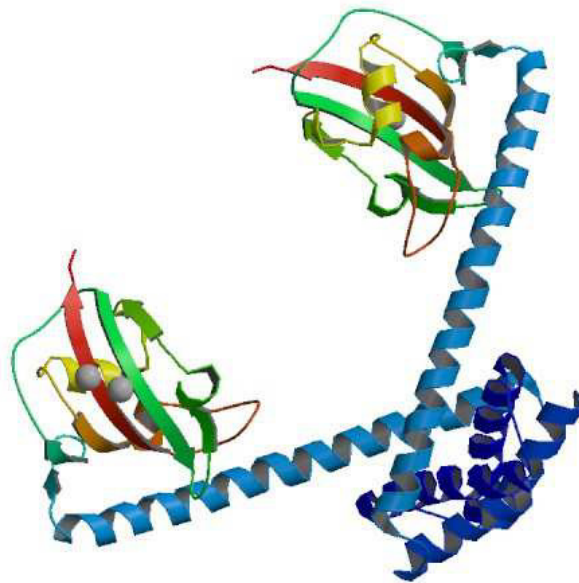


Abbildung 11: 3D-Struktur des Homodimers MIP [RIBOLDI-TUNNICLIFFE ET AL., 2001]

Das *L. pneumophila* Typ-II-Sekretionssystem Lsp wurde ebenfalls als Virulenzfaktor des Bakteriums charakterisiert [HALES, SHUMAN, 1999; LILES ET AL., 1999; ARAGON ET AL., 2000]. Durch dieses Sekretionssystem werden auch die Phospholipase-A und die Lysophospholipase-A sekretiert, was ein Hinweis auf eine mögliche Virulenz ist [ROSSIER, CIANCOTTO, 2001; FLIEGER ET AL., 2001; ARAGON ET AL., 2000]. Die Phospholipase-A-Aktivität zerstört die Phospholipide des Lungensurfactants (siehe Abb. 4 auf Seite 18), wodurch es zur Beeinträchtigung der Lungenfunktion kommt. Die Überexpression von *plaA* schützt die Legionellen vor der zytolytischen Aktivität des Lysophospholipids der Wirtszellen und ist damit für das Überleben in den Alveolarmakrophagen von großer Bedeutung. Dennoch zeigten auch bei diesem Schlüsselprotein *knock-out*-Experimente, dass *plaA*-Mutanten dem Wildtyp gegenüber eine vergleichbare intrazelluläre Überlebens- und Vermehrungsfähigkeit in Amöben und Makrophagen besitzen. Dies lässt vermuten, dass *plaA* für die Legionellen nicht essentiell ist und beispielsweise durch andere vorhandene Lysophospholipasen A ersetzt werden könnte. [FLIEGER ET AL., 2003]

Zusammenfassend kann man sagen, dass bereits durch die bisherigen Forschungen ersichtlich wird, dass die Legionellen über viele verzweigte Pathways die Legionellose auslösen. Dabei ist es schwer zu sagen, ob das Fehlen eines Proteins direkt zum Verlust der Virulenz des Organismus führt. Dennoch werden sich anhand der

Legionellose Karte und den in dieser Arbeit gewonnen Informationen über das Vorhandensein der einzelnen Schlüsselproteine in den drei Zielspezies Aussagen über die Bedeutung der Ergebnisse und die damit in Zusammenhang stehende Virulenz treffen lassen.

2.3 Bioinformatische Grundlagen

Dieser Abschnitt soll die Grundlagen der für die Masterarbeit relevanten bioinformatischen Sachverhalte erläutern. Dazu zählen die Methoden der Genomsequenzierung, -assemblierung und -annotation, sowie Sequenzalignments.

2.3.1 Genomsequenzierung

Das Ziel der Genomsequenzierung ist die Entschlüsselung des kompletten Erbguts eines Organismus. Dazu benötigt man zunächst eine Kartierung des Genoms. Bei dieser werden sogenannte Kartierungsmarker für die spätere Assemblierung der erzeugten DNA-Fragmente hergestellt. Das heißt, das Genom wird in mehrere Orte zerlegt, welche zur Orientierung genauer beschrieben werden. So können letztlich gewonnene Informationen leichter an die richtigen Stellen im Genom gesetzt werden. Anschließend wird die Genomsequenz in kürzere Abschnitte, sogenannte *Reads*, zerlegt, um die Sequenzierung zu erleichtern (Abb. 12). Dazu kann man die Abschnitte beispielsweise in *bacterial artificial chromosomes* (BACs) klonieren, welche wiederum in Subklone zerlegt werden. Danach wird die Sequenzierung in, durch die Kartierung, festgelegter Reihenfolge der Klone und Subklone durchgeführt. [UNBEKANNTER VERFASSER: GENOMSEQUENZIERUNG UND GENOMKARTIERUNG; PAGEL, 2005]

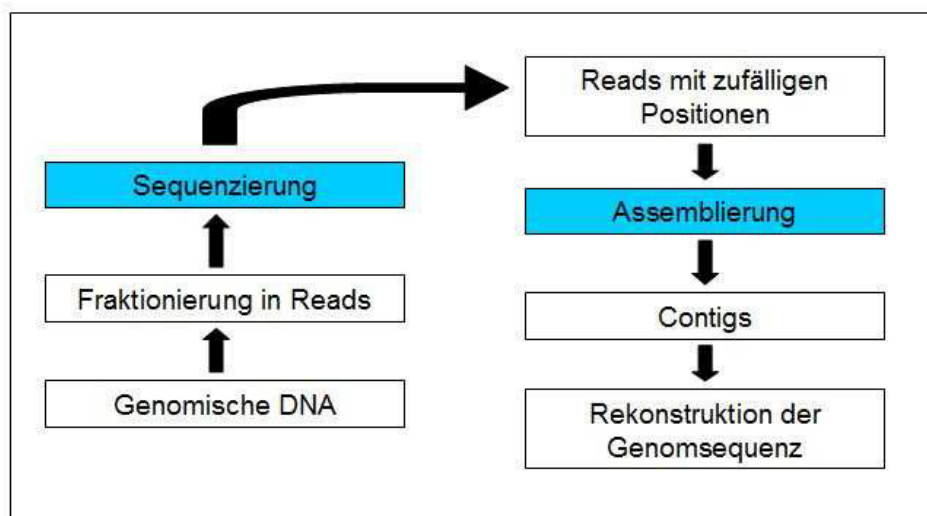


Abbildung 12: Verlaufsschema – Von der genomischen DNA zur rekonstruierten Genomsequenz

Im Schema ist der Weg der Genomsequenzierung und –assemblierung von der genomischen DNA bis zur Rekonstruktion der Genomsequenz dargestellt. [modifiziert nach HUTTER, 2011]

2.3.2 Genomassemblierung

Bei der Genomassemblierung werden die zuvor sequenzierten zufälligen *Reads* mittels Assemblierungssoftware zu sogenannten *Contigs* zusammengefügt (siehe Abb. 12). Dabei werden bei dem angewandten *de novo assembly*, bei dem keine oder wenige Informationen über das Genom, Transkripte oder Proteine des Organismus vorliegen, drei grundlegende Strategien genutzt. Der *Greedy Algorithmus* und die *Overlap-Layout-Consensus* Methode basieren auf der Suche nach paarweisen Alignments. Die *Euler-Pfad* Methode nutzt eine erstellte Liste aller Oligomere einer gegebenen Länge und verzichtet so auf die Berechnung paarweiser Alignments. Die erhaltenen *Contigs* werden anschließend zu *Scaffolds* zusammengefasst (Abb. 13). Dabei ergeben die *Contigs* ein *Scaffold*, deren relative Lage zueinander, ihre Reihenfolge und die Lage auf dem Genom bekannt sind. Immer noch existierende Lücken zwischen den *Contigs* werden mit N's (für Nukleotid) gefüllt. Die Anzahl der N's wird anhand des Abstands zwischen den Scaffolds geschätzt. [HUTTER, 2011]

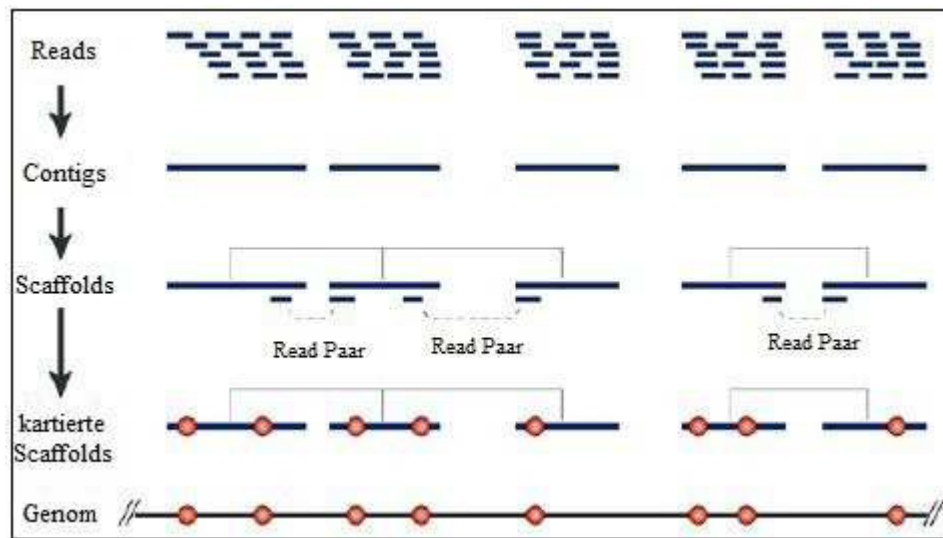


Abbildung 13: Scaffolding

Die Abbildung zeigt den Verlauf des *Scaffoldings*. Dabei werden die aus den *Reads* gebildeten *Contigs* zu *Scaffolds* zusammengefasst. Die kartierten *Scaffolds* werden anschließend genutzt um eine Karte des Genoms zu erstellen. Nicht gefüllte Abstände zwischen den *Contigs* werden mit N's (für Nukleotid) gefüllt. [modifiziert nach GREEN, 2001]

2.3.3 Genomannotation

Ziel der Genomannotation ist es die sequenzierten Genome der drei Legionellen Spezies mit Anmerkungen zu versehen, d.h. an welcher Stelle auf den Genomen befinden sich beispielsweise Gene, die für welche Proteine kodieren. Hierfür gibt es Programme, welche die Genomsequenzen zunächst in mögliche *Open Reading Frames* (ORF's) einteilen. Anschließend werden die dadurch entstandenen Aminosäuresequenzen mit Proteindatenbanken verglichen, um so mögliche Genprodukte ausfindig zu machen. Auch der Vergleich der DNA-Sequenz mit Nukleotiddatenbanken ist möglich. Dieser kann jedoch zu Frameshift-Fehlern führen. Neben der Einteilung der Sequenz in ORF's ist außerdem die Suche nach Start- und Stopcodons einer der Startpunkte eines Annotationsprogrammes.

2.3.4 Sequenzalignments

Für den Vergleich der Sequenzen der Schlüsselproteine in den Zielspezies mit denen der Referenzspezies werden Sequenzalignments durchgeführt, um etwas über ihre Ähnlichkeit zueinander und ihre Verwandtschaftsverhältnisse herauszufinden. Dabei werden die Proteinsequenzen paarweise mit einander verglichen, indem man die Aminosäuren einer Sequenz so einer anderen Sequenz zuordnet, dass die Reihenfolge erhalten bleibt. In einem Alignment können Fehlpaarungen (für Mutationen) und Lücken (für Deletionen oder Insertionen), sogenannte *Gaps*, auftreten. Umso identischer oder ähnlicher sich die zugeordneten Elemente der Sequenzen sind, was durch verwendete Scoring Matrizen vorgegeben ist, desto wahrscheinlicher ist eine evolutionäre oder funktionelle Verwandtschaft zwischen den Sequenzen.

Für die Suche nach ähnlichen Proteinsequenzen dient BLASTP (Basic Local Alignment Searching Tool Protein), ein Programm zur Analyse von Aminosäuresequenzen, welches eingegebene Zielsequenzen mit vorhandenen Datenbanksequenzen vergleicht. Das dadurch entstehende lokale Alignment kann anschließend weiter analysiert werden. Der von BLASTP ausgeführte Alignment-Algorithmus dient der Findung eines Alignments, das unter einer Kostenfunktion optimal ist. Dabei geben sogenannte Substitutionsmatrizen wie BLOSUM für die beim Alignment entstehenden Aminosäurenpaare zweier Sequenzen die Wahrscheinlichkeit für den Austausch dieses Sequenzelementpaares an. Das heißt es wird angegeben wie wahrscheinlich es ist, dass diese Paarung durch Evolution entstanden ist. Identische Elemente werden hoch bewertet, "ähnliche" Elemente weniger hoch, stark unterschiedliche Elemente setzen den *Score*, welcher die Homologie der Sequenzen definiert, herab. Für das Einfügen von *Gaps* und deren Erweiterung müssen ebenfalls bestimmte Kosten mit einberechnet werden, um den Aufwand für eine Deletion oder Insertion zu simulieren. Zur Bewertung des von BLAST erzeugten Alignments dient neben dem *Score*, welcher eine quantitative Bewertung der Ähnlichkeit zweier Sequenzen ist, auch der *E-Wert*. Dieser gibt die erwartete Anzahl der Hits an, die zufällig erwartet werden und deren Score mindestens so groß ist wie der Beobachtete. Das heißt, bei einem E-Wert von $2E-35$ wird erwartet dieses Alignment $2E-35$ -mal zufällig als Ergebnis angezeigt zu bekommen. Ein hoher E-Wert bedeutet also, dass der gefundene Hit auch nur ein Zufallsprodukt sein kann und nicht wirklich einer biologischen Ähnlichkeit entspricht. Bis zu welchem genauen E-Wert davon auszugehen ist, dass zwei Sequenzen biologisch mit einander in Verbindung stehen, kann nicht gesagt werden, denn dies

hängt zusätzlich von Zielsequenz- und Datenbanksequenzlängen ab. Ein NCBI Richtwert für ein Alignment einer Proteinsequenz gegen die Proteindatenbank unter Verwendung von BLASTP ist ein E-Wert von $1E-6$. [NCBI: BLAST]

Bei einem Multiplen Sequenzalignment (MSA), welches von den Schlüsselproteinen der verschiedenen Spezies durchgeführt werden soll um eine Aussage über ihre Verwandtschaft treffen zu können, werden nicht nur zwei Sequenzen miteinander aligniert, sondern zeitgleich mehrere. Dazu berechnet man zunächst alle optimalen paarweisen Alignments aller Sequenzen, woraus zum Beispiel mittels dem Clusteralgorithmus *Neighbor-Joining* ein *Guide Tree* erstellt wird. Anhand dieses Baumes wird letztlich progressiv (schrittweise, beginnend an den Blättern des Baumes) das multiple Alignment bestimmt. Zur Veranschaulichung der evolutionären Beziehungen zwischen den Sequenzen nutzt man sogenannte *Phylogenetische Bäume*.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Daten

Grundlage der Genomannotation waren die Genomsequenzdaten der *Whole Genome Shotgun* (WGS) *sequencing* Projekte von *Legionella anisa* str. *Linanissette*, *Legionella drancourtii* str. *LLAP12* und *Legionella shakespearei* DSM 23087. Die Informationen der vom NCBI (National Center for Biotechnology Information) veröffentlichten Sequenzdaten sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Genomsequenzdaten

Organismus	Eintragsnummer	Eintragungsdatum	Contigs	Basenpaare	Isolationsquelle
<i>Legionella anisa</i> str. <i>Linanissette</i> ¹⁾	CANP000000000.1	22.01.2013	56	4.319.733	Amöbe
<i>Legionella drancourtii</i> str. <i>LLAP12</i> ²⁾	ACUL000000000.2	15.12.2011	213	4.070.090	keine Angabe
<i>Legionella shakespearei</i> DSM 23087 ³⁾	AREN000000000.1	23.04.2013	70	3.507.313	keine Angabe

1) NCBI: CANP000000000.1

2) NCBI: ACUL000000000.2

3) NCBI: AREN000000000.1

Zu Vergleichszwecken wurde der NCBI Eintrag *Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1 chromosome, complete genome* verwendet. Die Sequenzdaten wurden vom NCBI am 05. März 2010 unter dem Eintrag AE017354.1 veröffentlicht [NCBI: AE017354.1]. Das Genom besitzt 3.397.754 Basenpaare. Für die Spezies gibt es 2942 Protein Einträge im NCBI. Davon wurden die Aminosäuresequenzen der 26 Legionellose-relevanten Proteine für die Arbeit verwendet.

Alle Genomsequenzen sowie die 26 verwendeten Proteinsequenzen von *Legionella pneumophila str. Philadelphia 1* befinden sich auf der beigefügten CD-ROM im Ordner *Materialien*.

3.1.2 Softwares

Die verwendeten Programme, sowie deren Herausgeber und Quellen, sind in Tabelle 5 dargestellt. Bei den Softwares handelt es sich entweder um Open Source Software oder um Web-Dienste.

Tabelle 5: Verwendete Softwares

Software	Herausgeber	Website
BASys	Gary Van Domselaar	http://basys.ca/basys/cgi/submit.pl
BLASTP	National Library of Medicine	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClustalW	European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/
GeneMark	Georgia Institute of Technology, USA	http://exon.biology.gatech.edu/
Mega 5	Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S	http://www.megasoftware.net/

3.1.3 Labormaterialien für die Legionellen Kultivierung

Für die *in vitro*-Kultivierung der Legionellen wurden die folgenden Materialien verwendet.

Stamm

Legionella pneumophila ATCC 33152

Chemikalien

KCl/HCl-Puffer:

HCl	3,9 ml 0,2 M
KCl	25,0 ml 0,2 M
pH 2,2 ± 0,2 (mit 1M KOH einstellen)	

Aqua dest., steril

Medien

GVPC-Medium (BCYE-Medium mit Antibiotika und Glycinzusatz) nach DIN EN ISO 11731-2 als Fertigplatten von OXOID

Zusammensetzung pro l

Aktivkohle	2,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
ACES-Puffer	10,0 g
L-Cystein	0,4 g
Eisen(III)-pyrophosphat	0,25 g
α-Ketoglutarat	1,0 g
Glycin	3,0 g
Vancomycin	1 mg
Polymyxin B	80.000 IE
Cycloheximid	80 mg
Agar	17,0 g
pH 6,90 ± 0,05	

BCYE-Cys-Medium (ohne Cystein) nach DIN EN ISO 11731-2

als Bi-Plates von BIORAD

Geräte

Sterilisator

Messpipetten

sterile Impfösen und Pinzetten

Pumpe

Filtrationseinrichtung

Cellulose-Nitrat-Membranfilter, Porengröße 0,45 µm, Durchmesser 5 cm, mit schwarzem Gitter, steril

Sicherheitswerkbank

Stoppuhr

Culti-Loop™ (Remel Europe, Ltd.)

Brutschrank (Binder) 36°C ± 2°C

Wasserbad TWB 6 (julabo)

Wasserbad F10 (julabo)

pH-Messgerät

3.2 Methoden

In diesem Abschnitt werden die im Labor angewandten Methoden sowie die verwendeten Softwares erläutert.

3.2.1 *in vitro*-Kultivierung von Legionellen

Anlegen eines Stammhaltungssystems

Für die Kultivierungsversuche von Legionellen in sterilem Wasser wurde zunächst der Stamm *Legionella pneumophila* ATCC 33152 mittels *Culti-Loop*TM (Remel Europe, Ltd.) auf GVPC-Selektivagar-Platten für 24 Stunden bei 36°C ± 2°C inkubiert. Anschließend wurden zwei bis drei gleichgroße Kolonien für das Anlegen eines Stammhaltungssystems nach Anleitung von CryobankTM, Fa. MAST DIAGNOSTIKA, Germany verwendet. Mit Hilfe einer sterilen Impföse wurden die Kolonien in ein CRYOBANKTM Kryoröhrchen überführt. Nach Verschließen des Röhrchens wurde es gut geschüttelt um den Organismus im Kryomedium mit den darin befindlichen Globuli zu verteilen. Mit einer sterilen Pipette wurde so viel wie möglich Kryomedium aus dem Röhrchen entfernt und dieses wieder fest verschlossen. Bis zur Rekultivierung der Legionellen wurde das Kryoröhrchen mit den auf den Kügelchen immobilisierten *Legionella pneumophila* Zellen bei -20°C aufbewahrt.

Rekultivierung der Legionellen

Für die Rekultivierung der Legionellen wurde das Kryoröhrchen aus dem Gefrierschrank entnommen und mit einer sterilen Pinzette ein ringförmiges Kügelchen in steriles Wasser überführt. Dabei wurden für die verschiedenen Kultivierungsverfahren unterschiedliche Ansätze genutzt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ansätze der Kultivierungsversuche

Kultivierungsbedingung	Ansatz
in Glasflaschen bei 37°C	1 Globuli auf 500 ml steriles Wasser → davon je 50 ml für Kultivierung in 9 Flaschen mit je 200 ml sterilem Wasser überführt
in Glasflasche bei Zimmertemperatur	1 Globuli auf 600 ml steriles Wasser
in Glasflasche im Kühlschrank	1 Globuli auf 600 ml steriles Wasser
in Glasflaschen bei 30°C und täglichem Schütteln mit Sauerstoffzufuhr (Öffnen der Flaschen)	1 Globuli auf 500 ml steriles Wasser → davon je 100 ml für Kultivierung in 5 Flaschen mit je 110 ml sterilem Wasser überführt
direkt im Wasserbecken bei 37°C und Zirkulation (Abb. 14)	1 Kolonie von GVPC-Selektivagar-Platte in 10 ml steriles H ₂ O → 0,1 ml auf 9,9 ml steriles H ₂ O → 0,1 ml auf 9,9 ml steriles H ₂ O → 5 ml auf 5 l steriles H ₂ O

**Abbildung 14: Wasserbad mit Zirkulation**

Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau des Wasserbads mit dauerhafter Zirkulation.

Untersuchungsmethode auf Legionellen

Für die Untersuchung der Proben auf die Anzahl der Legionellen pro 100 ml wurde die Membranfiltration nach DIN EN ISO 11731-2 verwendet. Dabei wurden 100 ml der Probe mittels Pumpe und Vakuum durch einen 0,45 µm Cellulose-Nitrat-Filter filtriert, der Filter zum Zweck der Abtötung der Begleitflora für 5 min mit 30 + 5 ml KCl/HCl-Puffer überschichtet und nach dem Absaugen mit 20 + 5 ml sterilem Aqua dest. gespült. Dabei war darauf zu achten, dass nur die mit Säurepuffer benetzten Bereiche der Filtrationseinheit mit Aqua dest. gespült werden, um eine Neukontamination des Membranfilters zu verhindern. Der Cellulose-Nitrat-Filter wurde mit einer sterilen Pinzette auf eine GVPC-Selektivagar-Platte gelegt und die Platte sofort auf den Deckel gestellt. Ebenso wurden zweimal je 0,5 ml der Probe mittels Direktausstrich auf GVPC-Selektivagar-Platten aufgebracht und die Platten nach dem vollständigen Antrocknen der Probenmenge umgedreht. Alle GVPC-Selektivagar-Platte wurden im Brutschrank bei $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ für 10 Tage inkubiert. Die makroskopische Untersuchung der bebrüteten Platten erfolgte im Inkubationszeitraum ab dem 3. oder 4. Tag mindestens zweimal; das letzte Mal (mindestens das dritte Mal) am 10. Tag. Gewachsene legionellentypische Kolonien (glatt, scharfer Rand, uhrglasförmig, weiß-grau-blau-violett) wurden auf sogenannte BCYE-Bi-Plates, bei denen das Medium auf der einen Hälfte das für Legionellen essentielle Cystein enthält (GVPC-Agar) und die andere nicht (cysteinfreies BCYE-Agar), isoliert. Die Kolonien, welche nur auf dem GVPC-Agar mit Cystein gewachsen sind, nicht aber auf dem cysteinfreien BCYE-Medium, sind als positiv für *Legionella spec.* zu bewerten.

Die Keimzahlbestimmung pro 100 ml erfolgt durch die Auszählung der gewachsenen Kolonien auf dem Filter sowie den Direktausstrichen nach folgender Formel.

$$C_s = \frac{Z}{V_{\text{tot}}} * V_s$$

Dabei ist C_s die berechnete Anzahl an KBE im Referenzvolumen V_s der Probe. Z ist die Summe aller gezählten Kolonien auf den Platten oder Membranfiltern verschiedener Volumina der Untersuchungsprobe. V_s ist das gewählte Referenzvolumen zur Angabe der Konzentration der Mikroorganismen in einer Probe, hier 100 ml. V_{tot} ist das berechnete Gesamtvolumen der Originalprobe in den ausgezählten Platten.

3.2.2 GeneMark

Die 1993 entwickelte Genfindungsmethode GeneMark hält für die Genvorhersage in Bakteriengenomen zwei gekoppelte Methoden bereit: GeneMark.hmm¹ und GeneMarkS². Der GeneMark Algorithmus nutzte artspezifische inhomogene Markov-Ketten Modelle der kodierenden DNA Sequenzen, sowie homogene Markov-Ketten Modelle für die nichtkodierenden DNA Abschnitte. GeneMark.hmm verbessert GeneMark vor allem bei der Suche nach exakten Genstarts. Dies wird unter anderen durch Ribosomalebindungsstellen (RBS)-Modelle realisiert. Außerdem wurden die GeneMark Modelle in natürlich designte Hidden Markov Modelle integriert. [GEORGIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY, USA: GENEMARK.HMM] Dies sind stochastische Modelle, welche sich durch zwei Zufallsprozesse beschreiben lassen. Bei dem ersten handelt es sich um eine durch Zustände und Übergangswahrscheinlichkeiten definierte Markov-Kette. Da die Zustände von außen allerdings nicht direkt sichtbar sind, spricht man von verborgenen (hidden) Markov Modellen. Für die Beobachtbarkeit erzeugt der zweite Zufallsprozess entsprechend einer zustandsabhängigen Wahrscheinlichkeitsverteilung dauerhaft sichtbare Ausgangssymbole.

GeneMarkS ist eine Genomannotationsmethode, welche für neu sequenzierte prokaryontische Genome genutzt werden kann und ein nichtüberwachtes Trainingsverfahren nutzt. Die GeneMarkS Implementierung basiert auf einer verbesserten Version der Genidentifikationssoftware GeneMark.hmm [LUKASHIN, BORODOVSKY, 1998], heuristischen Markov Modellen von kodierenden und nicht-kodierenden Regionen und dem *sampling multiple alignment* Programm Gibbs [NEUWALD, LIU, LAWRENCE, 1995; BESEMER, LOMSADZE, BORODOVSKY, 2001].

Die Vorgehensweise von GeneMarkS ist in der Abbildung 15 Schritt für Schritt dargestellt. Im ersten Schritt werden die Parameter der heuristischen Markov Modelle bestimmt. Diese heuristischen Modelle enthalten neben Markov Modellen für die kodierenden und nicht-kodierenden Sequenzen auch tabellarisierte Daten über die lineare Abhängigkeit zwischen der Häufigkeit mit der ein Nukleotid in einem Codon oder global vorkommt, sowie der Häufigkeit mit der eine Aminosäure im Proteom einer Gattung vorkommt. Des Weiteren sind der GC-Gehalt des Genoms und analytisch oder

¹ Hidden Markov Modelle

² self-training = selbst trainierend

numerisch beschriebene Längenverteilungen von kodierenden oder nicht-kodierenden Regionen enthalten. [BESEMER, BORODOVSKY, 1999] Dazu wurden für GeneMarkS die Längenverteilungen des *Legionella pneumophila* Philadelphia 1 Genoms der GenBank Annotation genutzt. Mit Hilfe von GeneMark.hmm 2.0 werden im zweiten Schritt die kodierenden Regionen auf dem Genom ausfindig gemacht. Diese werden danach mit den *Gibbs* Datensätzen abgeglichen. Durch die multiplen Alignments werden so konservierte Stellen, die *upstream* von einem Beginn eines Gens liegen, bestimmt. GeneMark.hmm erstellt außerdem RBS-Modelle und besitzt die Möglichkeit überlappende Gene vorherzubestimmen. Im vierten Schritt sagt GeneMark.hmm die Gene für die kodierenden Regionen vorher. Danach erfolgt der reguläre Modellbildungsschritt. Dabei werden die Parameter für die RBS-Modelle und die sogenannten pseudonativen Modelle bestimmt. Diese sind kodierende Regionen, welche sich aus dem Hauptzyklus ergaben und somit von echten DNA-Sequenzen stammen, welche *in silico* in kodierende und nicht-kodierende Regionen klassifiziert wurden. [BESEMER, LOMSADZE, BORODOVSKY, 2001] Sie erfassen außerdem die artspezifischen Oligonukleotidhäufigkeiten viel besser als die heuristischen Modelle (Schritt 1). [BESEMER, BORODOVSKY, 1999] Neu annotierte Sequenzabschnitte werden in die Modelle eingearbeitet, so dass die Schritte des Hauptzyklus bis zur Konvergenz wiederholt werden. [BESEMER, LOMSADZE, BORODOVSKY, 2001]

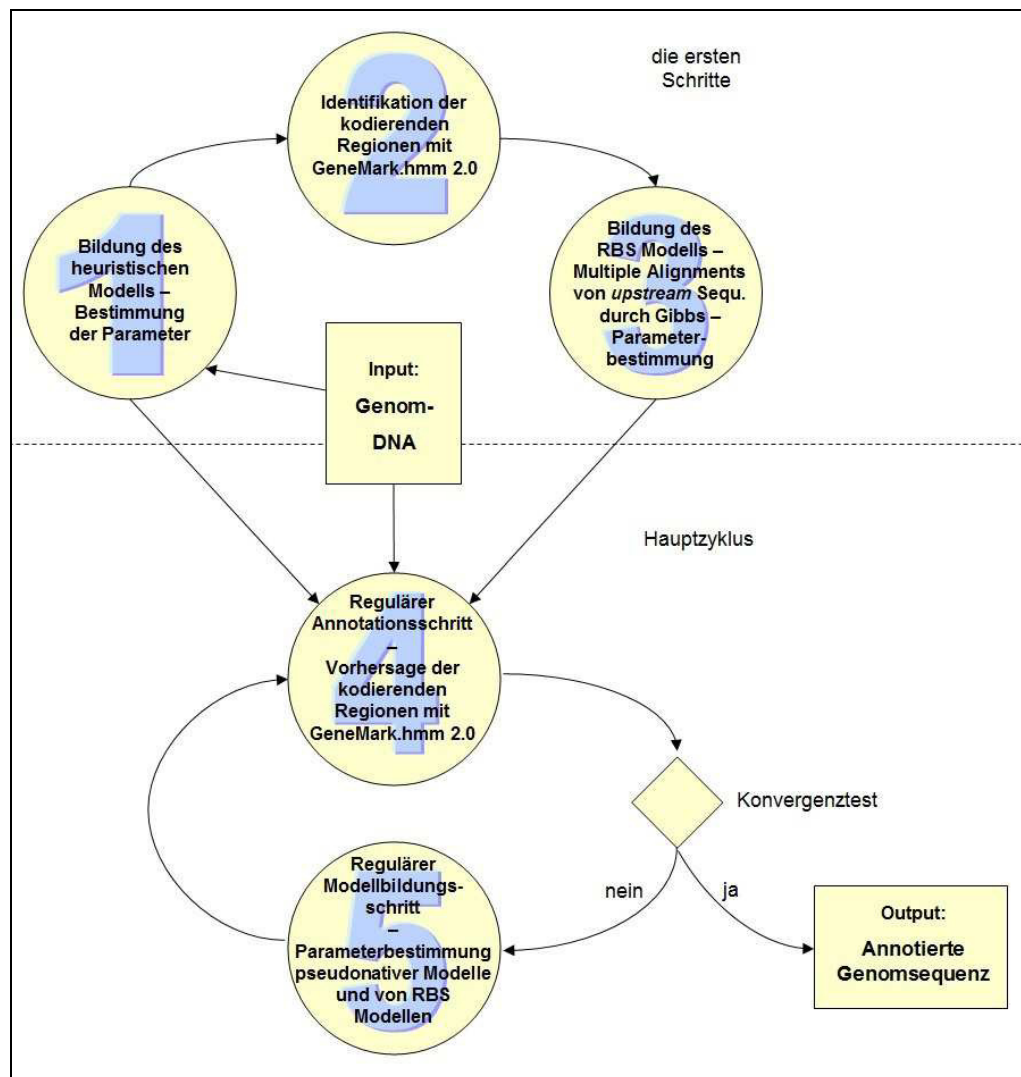


Abbildung 15: Darstellung der Vorgehensweise von GeneMarkS

Die Abbildung zeigt im oberen Bereich die initialen Schritte der Annotationssoftware GeneMark. Im weiteren Verlauf ist der Hauptzyklus dargestellt, welcher sich bis zur vollständig annotierten Genomsequenz wiederholt. [modifiziert nach BESEMER, LOMSADZE, BORODOVSKY, 2001]

Sowohl GeneMarkS als auch GeneMark.hmm sind Webanwendungen, welche dem Nutzer nach dem Hochladen oder der Eingabe der Sequenz im GenBank, FASTA, GCG oder EMBL (European Molecular Biology Laboratory) Format oder als reinen Text, die Annotationsergebnisse per E-Mail übermitteln. Dazu gehören neben einer Tabelle, die die vorherbestimmten Gene, deren Position und Genprodukte enthält, bei GeneMarkS auch eine sogenannte *PostSkript* Grafik, welche den GC-Gehalt angibt und die Annotationen in einem Diagramm darstellt.

Die Genomsequenzen von *Legionella anisa* str. *Linanisette*, *Legionella drancourtii* str. *LLAP12* und *Legionella shakespearei* DSM 23087 wurden im FASTA-Format an GeneMark übermittelt.

3.2.3 BASys

BASys (Bacterial Annotation System) ist ein Webserver, welcher detaillierte, automatisierte Annotationen von Bakteriengenomsequenzen (Chromosomen- und Plasmid-DNA) anbietet. Grundsätzlich besteht BASys aus drei Teilen: (i) ein Front-End Web Interface für die Übertragung von Rohdaten, die Vorbereitung der Annotation und die Darstellung des Fortschritts des Annotationsprozesses; (ii) eine Annotationsmaschine für die Analyse der Daten und die Generierung der Annotationen; und (iii) ein Auswertungssystem für die Wiedergabe der verschiedenen Grafiken und die Ausgabe von HTML und Text. [VAN DOMSELAAR ET AL., 2005]

Die Nutzung aller Funktionen von BASys steht sowohl registrierten als auch anonymen Nutzern zur Verfügung. Dazu wird dem Nutzer bei einem anonymen Annotationsauftrag per E-Mail eine sichere URL zugesandt, um sich den Annotationsfortschritt oder die Ergebnisse der Annotation anzuschauen. [VAN DOMSELAAR ET AL., 2005]

Für die Übertragung der Sequenzdaten musste zunächst eine Datei hochgeladen werden, welche die Genomsequenz im FASTA-Format enthält. Des Weiteren waren die Angaben über die Chromosomenstruktur (ringförmig oder linear) und das „Gramverhalten“, sowie die Eingabe eines frei gewählten Namens für die Identifikation der Ausgabedatei erforderlich. Außerdem konnten Angaben zur Gattung und Spezies und zum Stamm gemacht werden. Die von GeneMark generierte Gen-Identifikations-Tabelle wurde als TXT-Datei an das System übermittelt und durch BASys weiter verarbeitet. Nachdem ein Annotationsauftrag vollständig übermittelt wurde, wird er in eine Warteschlange eingereiht und für die Annotation von der BASys Annotationsmaschine vorbereitet. [VAN DOMSELAAR ET AL., 2005]

BASys ist in der Lage ein Bakteriengenom mit einer Durchschnittsgröße von etwa 5 Mb oder 3000 Genen in ca. 24 Stunden komplett zu bearbeiten. Um die Menge an übertragenen Annotationsaufträgen und die Größe der Genomsequenzen zu bewältigen, wurde BASys als ein verteiltes System implementiert, welches eine

gebündelte Datenverarbeitungsumgebung nutzt (Abb. 16). Der Hauptknoten beinhaltet den Webserver und führt das Warteschlangen- und Zeitplanungssystem aus. Jeder Folgeknoten besitzt eine BASys Annotationsmaschine und ein Benachrichtigungssystem. Neben dem Empfang und der Validierung der Daten prüft der Hauptknoten die aktuelle Verarbeitungslast für jeden Folgeknoten, beauftragt den Knoten mit der größten Verfügbarkeit mit einem Annotationsauftrag und informiert ihn darüber. Außerdem ist der Hauptknoten in der Lage Anweisungen zur Aufhebung, Wiederaufnahme, Neustart und zum Entfernen von Annotationsaufgaben an die Folgeknoten zu geben. Jeder Folgeknoten kommuniziert ständig mit dem Hauptknoten und überträgt Informationen über den Fortschritt einer Annotation. Wird der Hauptknoten über den Abschluss eines Annotationsauftrages informiert, so teilt er dem Nutzer per E-Mail mit, dass der Auftrag fertig gestellt wurde. [VAN DOMSELAAR *ET AL.*, 2005]

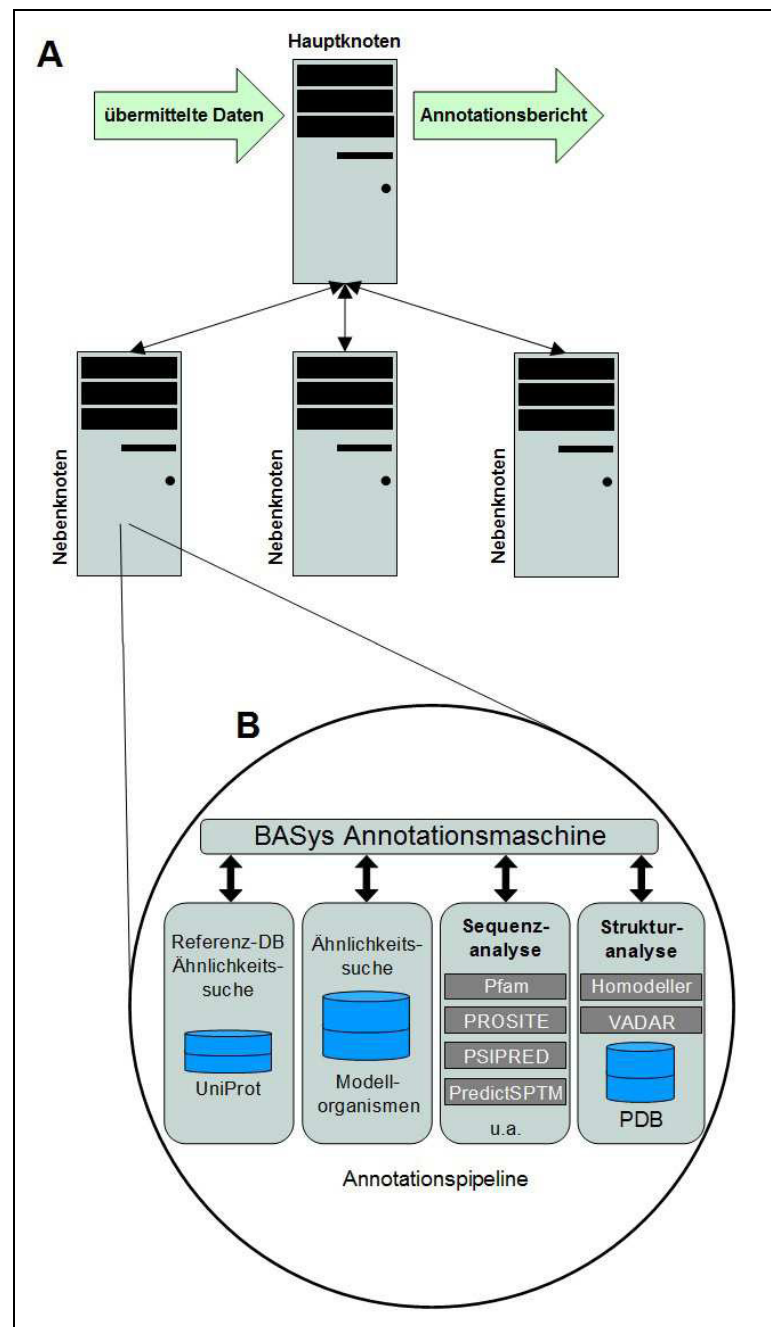


Abbildung 16: Schematische Darstellung des BASys Aufbaus

(A) Der im Hauptknoten befindliche Webserver nimmt die vom Nutzer übermittelten Daten auf und übernimmt die Planung der Aufgaben und die Verteilung auf die Nebenknoten, welche die Annotationen durchführen. (B) Jeder Nebenknoten beinhaltet eine BASys Annotationsmaschine. Die Annotationspipeline kombiniert Ähnlichkeitssuche und Sequenz- und Strukturanalyse um die Annotationen zu erstellen.

[modifiziert nach VAN DOMSELAAR *ET AL.*, 2005]

Die BASys Annotationsmaschine nutzt sowohl Datenbankvergleiche als auch computergenerierte Sequenzanalysen für die Annotationsaufträge (siehe Abb. 16). Die übersetzten kodierenden Sequenzen werden mit Hilfe von BLAST [ALTSCHUL *ET AL.*, 1990] mit dem aufwändig und fachmännisch annotierten Referenzdatenbestand der UniProt [APWEILER *ET AL.*, 2004] verglichen. Mit jedem Annotationstypen, wie zum Beispiel Funktion, metabolische Rolle, strukturelle Familie oder Enzymklassifizierung, sind sogenannte Ähnlichkeitsgrenzwerte verbunden. Der Ähnlichkeitsscore zwischen der Suchanfragesequenz und den Datenbanksequenzen wird mit dem Ähnlichkeitsgrenzwert für jeden Annotationstypen verglichen, so dass geeignete Annotationen vorläufig in die Genomsequenz eingetragen werden. So wird zum Beispiel für die Eintragung eines besonderen Merkmals, wie beispielsweise einer Transmembrandomäne, eine perfekte Übereinstimmung der Such- und Datenbanksequenz benötigt. Sollen jedoch nur allgemeine Funktionen eingetragen werden, so reicht ein BLAST Erwartungswert von 1×10^{-10} oder besser. Fortgesetzt wird der Annotationsvorgang mit der BLAST Suche gegen spezialisierte Datenbanken für Proteinsequenzen von Modellorganismen. Des Weiteren werden verschiedenste Sequenzanalysen durchgeführt, wie zum Beispiel die Analyse der Proteinfamilien mit Pfam, Sequenzmotifanalysen mit PROSITE, Signalpeptid- und Transmembrandomänvorhersagen mit PredictSPTM oder die Vorhersage der Sekundärstruktur mit PSIPRED. Letztlich wird, wenn die Suchsequenz ausreichend Ähnlichkeit mit einer Sequenz der PDB (Protein Data Bank) hat, mit Hilfe von HOMODELLER ein Homologiemodell erstellt und anschließend mit VADAR eine Strukturanalyse durchgeführt. Weitere Annotationen, wie beispielsweise das molekulare Proteingewicht, der isoelektrische Punkt oder die Operonstruktur, werden direkt von der chromosomalen, kodierenden Nukleotidsequenz und der Proteinsequenz berechnet. So werden insgesamt etwa 60 verschiedene Annotationen für jedes Gen erzeugt. [WILLARD *ET AL.*, 2003]

Die Annotationsergebnisse werden dem Nutzer in verschiedenen Darstellungen präsentiert. Dabei stellt eine navigierbare Genomkarte alle identifizierten Gene übersichtlich dar und enthält zu jedem Gen einen Hyperlink zu sogenannten Genkarten, welche alle Annotationen des jeweiligen Gens enthalten. Des Weiteren ist in jeder Genkarte genau nach zu verfolgen von welchen Quellen die jeweiligen Einträge stammen und von welcher Qualität die Annotationen sind. Dem Nutzer werden außerdem diverse Dateien zur Verfügung gestellt, darunter FASTA-Dateien mit allen Proteinen und Genen und eine Datei mit allen Genen im GenBank-Format. Die sogenannte „BASys Annotation Summary Stats“ enthält Diagramme in denen die

Proteinlängen aller identifizierten Genprodukte, die Aminosäureverteilungen, die Lage der Proteine in den Zellen, die Funktion der Proteine, sowie die Häufigkeit der Nukleotide und der GC (Guanin, Cytosin)- und AT (Adenin, Thymin)-Gehalt dargestellt sind.

Die Genomannotation mit BASys wurde mit den von GeneMark generierten Gen-Identifikations-Tabellen der Organismen *Legionella anisa str. Linanisette*, *Legionella drancourtii str. LLAP12* und *Legionella shakespearei DSM 23087* durchgeführt.

3.2.4 BLASTP

Mit allen Schlüsselproteinen des Referenzorganismus *Legionella pneumophila* Philadelphia 1 wurde jeweils ein Alignment gegen alle von BASys vorherbestimmten Proteine der Organismen *Legionella anisa str. Linanisette*, *Legionella drancourtii str. LLAP12* und *Legionella shakespearei DSM 23087* durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Einstellungen verwendet:

E-Wert Grenzwert: 10

Wortlänge: 3

Maximalanzahl von Paarungen in einem definierten Zielsequenzbereich: 0

Substitutionsmatrix: BLOSUM62

Lückenkosten: Einführung 11, Erweiterung 1

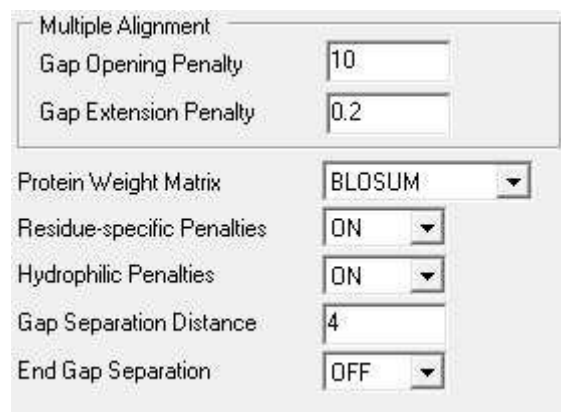
3.2.5 ClustalW

ClustalW wurde für die Ausführung von Multiplen Sequenzalignments genutzt. Dazu wurden für die Proteine, welche durch BLASTP in allen Organismen gefunden werden konnten, Distanzmatrizen und phylogenetische Bäume durch ClustalW erstellt. Dies konnte direkt aus der Software Mega 5 heraus realisiert werden.

3.2.6 Mega 5

„Molecular Evolutionary Genetics Analysis“ 5 ist eine zum Download freie Software zur Ausführung von Sequenzalignments, der Generierung Phylogenetischer Bäume und der Suche in web-basierten Datenbanken. Der Vorteil von Mega 5 ist, dass direkt aus dem Programm heraus auf die verschiedensten Tools und Datenbanken zugegriffen werden kann. Das erspart dem Nutzer das zeitaufwendigere Besuchen mehrerer web-basierter Tools.

Mega 5 wurde für die Durchführung der Multiplen Sequenzalignments mittels ClustalW (Einstellungen siehe Abbildung 17) genutzt sowie für die Erzeugung der Phylogenetischen Bäume mit der Neighbor-Joining Methode.



Multiple Alignment	
Gap Opening Penalty	10
Gap Extension Penalty	0.2
Protein Weight Matrix	BLOSUM
Residue-specific Penalties	ON
Hydrophilic Penalties	ON
Gap Separation Distance	4
End Gap Separation	OFF

Abbildung 17: ClustalW Parameter in der Software Mega 5

Die Abbildung zeigt die für das Multiple Sequenzalignment gewählten Einstellungen. Unter anderen *Gap* Eröffnungskosten von 10 und *Gap* Erweiterungskosten von 0,2. Als Substitutionsmatrize wurde BLOSUM verwendet.

4 Ergebnisse

Alle in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse befinden sich in vollständiger Form auf der CD-ROM.

4.1 *in vitro*-Kultivierung von Legionellen

In Tabelle 7 sowie Abbildung 18 sind die Ergebnisse der *in vitro*-Kultivierungsversuche von *Legionella pneumophila* ATCC 33152 dargestellt. Die Tabelle zeigt die mittels Membranfiltration ermittelten Zahlen der koloniebildenden Einheiten pro 100 ml für den jeweiligen Tag der Kultivierungsdauer. In der Abbildung sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Tabelle 7: Ergebnisse der Kultivierungsversuche

Kultivierungs- dauer in Tagen	in Glasflaschen bei 37°C	direkt im Wasserbecken bei 37°C mit Zirkulation	in Glasflasche bei Zimmer- temperatur	in Glasflasche im Kühlschrank
	KBE/100 ml	KBE/100 ml	KBE/100 ml	KBE/100 ml
0	900	500	1700	8200
0,25	17			
1	12	0		
2	1		100	1800
3	0		50	2700
6			100	400
7			100	300
8			17	300
9			100	17
10			100	19

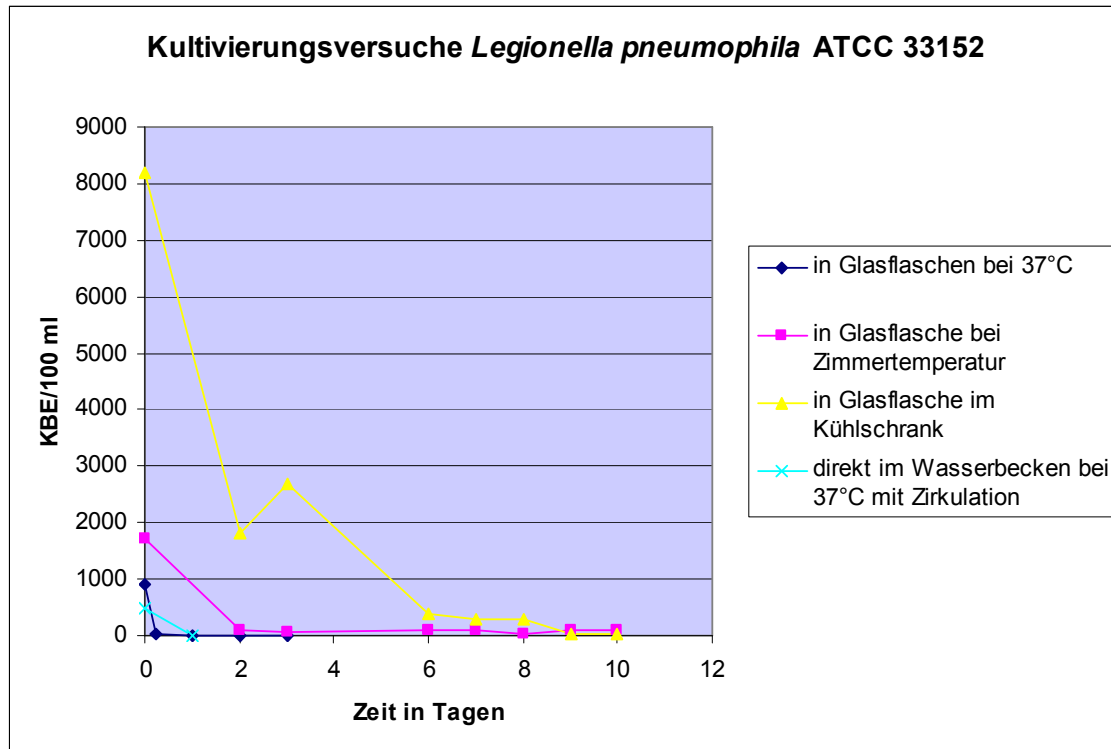


Abbildung 18: Ergebnisse der Kultivierungsversuche

Im Diagramm sind *Legionella pneumophila* KBE/100 ml gegen die Kultivierungsdauer in Tagen aufgetragen. Dargestellt sind die mittels Membranfiltration ermittelten Ergebnisse für die Versuche „in Glasflaschen bei 37°C“ (blau), „in Glasflasche bei Zimmertemperatur“ (pink), „in Glasflasche im Kühlschrank“ (gelb) und „direkt im Wasserbecken bei 27°C mit Zirkulation“ (türkis).

Abbildung 19 zeigt ein Beispiel für die Überprüfung der kultivierten Kolonien auf Bi-Plates. Auf der Platte wurden jeweils fünf Einzelkolonien zunächst links (Agar ohne Cystein) und dann rechts (Agar mit Cystein) ausgestrichen. Bis auf eine Kolonie waren alle in der Lage auf beiden Seiten der Bi-Platte zu wachsen.



Abbildung 19: Überprüfung der isolierten Kolonien auf Bi-Plates

Die Abbildung zeigt fünf Einzelkolonien, welche jeweils links und rechts nebeneinander ausgestrichen wurden. Bis auf den Stamm in der Mitte, sind alle Stämme auf beiden Seiten gewachsen.

4.2 GeneMark

Eine Zusammenfassung der von GeneMark übermittelten Ergebnisse für *Legionella anisa* str. *Linanissette*, *Legionella drancourtii* str. *LLAP12* und *Legionella shakespearei* DSM 23087 ist in Tabelle 8 ersichtlich. Die vollständigen Ergebnisse befinden sich in vollständiger Form auf der CD-ROM im Ordner *Ergebnisse\GeneMark*. Die GeneMark Resultate beinhalten den GC-Gehalt der Genomsequenz und geben eine Übersicht über alle vorherbestimmten Gene, deren Lokalisation auf dem Genom sowie deren Übersetzung in Proteinsequenzen.

Tabelle 8: Zusammenfassung der GeneMark Ergebnisse

	<i>Legionella anisa</i> <i>str. Linanisetete</i>	<i>Legionella</i> <i>drancourtii str.</i> <i>LLAP12</i>	<i>Legionella</i> <i>shakespearei</i> <i>DSM 23087</i>
Anzahl vorher- bestimmter Gene	3981	3842	3058
GC-Gehalt	38.17 %	39.24 %	41.70 %

Ein Auszug der Tabelle der vorherbestimmten Gene für *Legionella anisa str. Linanisetete* ist in Abbildung 20 dargestellt. Enthalten sind darin die durchnummerierten Gene, + oder - für die Lage des jeweiligen Gens auf dem *forward* oder *reverse* Strang der doppelsträngigen DNA, das linke und rechte Ende des Gens sowie dessen Länge und die Klasse. Die Genvorhersage ergab sowohl Gene der typischen (Abb. 20: *Class 1*) als auch der atypischen (Abb. 20: *Class 2*) Klasse. Bei der atypischen Genklasse handelt es sich um Gene, bei denen vermutet wird, dass sie im Laufe der Evolution horizontal auf ein Bakteriengenom übertragen wurden.

Predicted genes					
Gene #	Strand	LeftEnd	RightEnd	Gene Length	Class
1	+	389	1441	1053	1
2	-	1481	2560	1080	1
3	+	2772	3716	945	1
4	-	3795	5021	1227	1
5	+	5294	6421	1128	1
6	-	6711	7961	1251	1
7	+	8266	8757	492	2
8	+	8833	9780	948	1
9	-	9918	10067	150	2
10	+	10200	11099	900	1

Abbildung 20: Auszug aus der durch GeneMark erzeugten Gentabelle für *L. anisa*

Die Abbildung zeigt die ersten 10 Gene die von GeneMark für *Legionella anisa str. Linanisetete* bestimmt wurden. Zu sehen sind auf welchem der beiden Komplementärstränge sich das jeweilige Gen befindet, sowie dessen linkes und rechtes Ende und seine Länge. Dargestellt ist außerdem die Klasse des Gens, 1 für die typische und 2 für die atypische Genklasse.

4.3 BASys

Unter Verwendung der GeneMark Genvorhersagetabellen der drei Organismen ergab die Genomannotation von *Legionella anisa* str. *Linanissette* eine Anzahl von 3980 Genen. Für *Legionella drancourtii* str. *LLAP12* wurden 3840 annotiert und für *Legionella shakespearei* DSM 23087 3057 Gene. Für alle drei Genome wurden sogenannte Genomkarten erstellt, wie in Abbildung 21 für *Legionella anisa* als Beispiel dargestellt. Diese enthält neben den Genen auf dem *forward* Strang in rot und den Genen auf dem *reverse* Strang in blau die Funktionsarten, ersichtlich in Tabelle 16 (siehe Anlagen Teil 2), der jeweiligen Gene und ihrer Produkte in verschiedenen Farben. Alle HTML-Dateien der navigierbaren Genomkarten, welche in verschiedenen Zoomfaktoren zur Verfügung stehen, sowie eine Liste aller annotierten Gene, befinden sich in den Ordnern *Ergebnisse\BASys\Legionella anisa* str. *Linanissette*, *Ergebnisse\BASys\Legionella drancourtii* str. *LLAP12* und *Ergebnisse\BASys\Legionella shakespearei* DSM 23087 auf der CD-ROM. Als Beispiel soll ein Auszug der Genomkarte für die Basenpaare 5322000 bis 5332800 genutzt werden. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, wurden für diesen Abschnitt des Genoms von *L. anisa* auf beiden Komplementärsträngen Gene vorhergesagt. Darunter befinden sich auch die Gene der Schlüsselproteine *lepA* und *lepB*. Des Weiteren ist zu erkennen, dass viele Gene den Namen BASYS tragen. Dabei handelt es sich entweder um Gene bei denen das Genprodukt bekannt ist, jedoch nicht der Genname, um hypothetische Proteine, welche als Datensätze in BASys vorliegen oder um neue hypothetische Proteine, welche noch nicht bestimmt wurden.

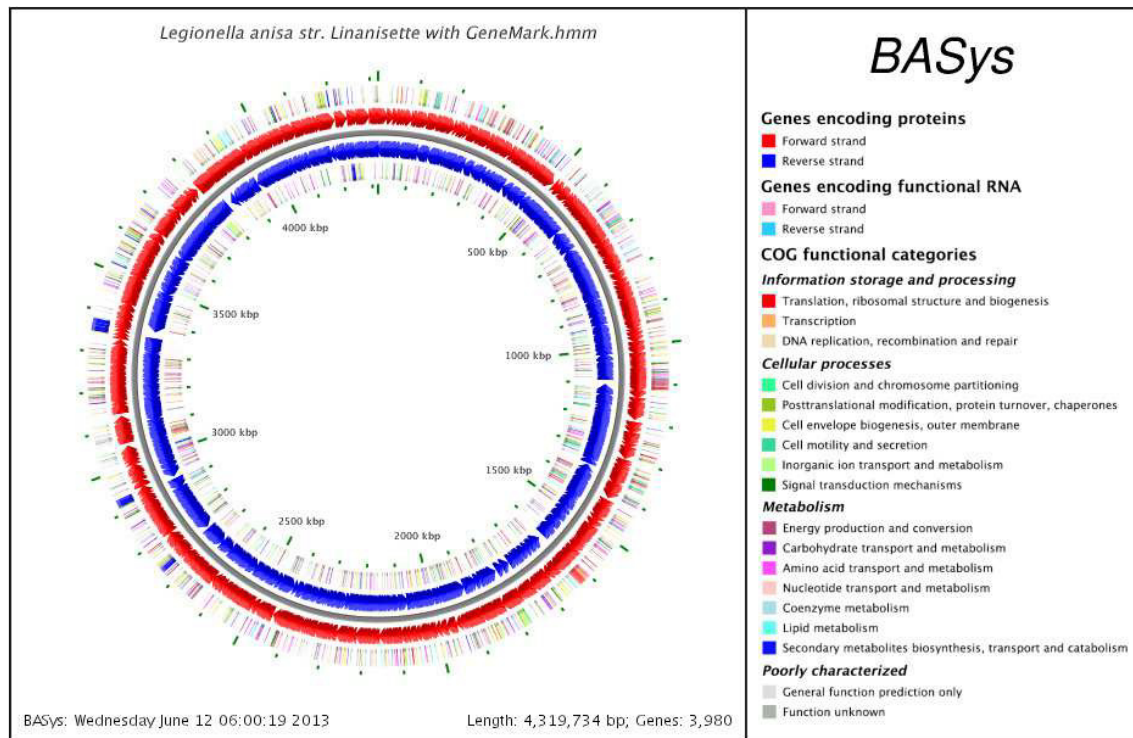


Abbildung 21: BASys Genomkarte für *Legionella anisa str. Linanisette*

In der Genomkarte dargestellt sind alle 3980 Gene des *forward* (rot) und *reverse* (blau) Strangs. Des Weiteren sind die annotierten Gene, wenn möglich, in COG Funktionsgruppen eingeteilt. Diese sind *Informationsspeicherung und –verarbeitung*, *Zellulare Prozesse*, *Metabolismus* und für generelle oder unbekannte Funktionen die *ungenau charakterisierten Funktionen*.

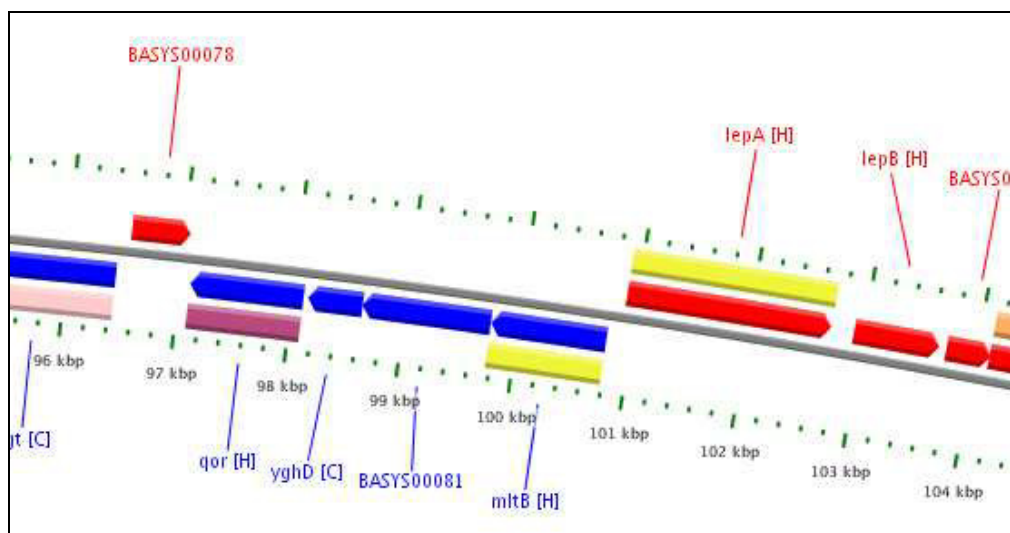


Abbildung 22: Auszug der Genomkarte von *Legionella anisa str. Linanisette*

Die Abbildung zeigt die annotierten Gene von *Legionella anisa str. Linanisette* für die Basenpaare 96000 bis 104000. In rot sind die Gene auf dem *forward* Strang, in blau die auf dem *reverse* Strang dargestellt. Außerdem sind verschiedene Funktionsbestimmungen zu erkennen.

Des Weiteren übermittelte BASys je zwei Dateien mit allen Gen- und Proteinsequenzen im FASTA Format für jeden Annotationsauftrag. Diese befinden sich ebenfalls in den oben genannten Ordnern auf der CD-ROM.

4.4 BLASTP

Die Ergebnisse aller BLASTP Suchen der Schlüsselproteine von *L. pneumophila* Philadelphia 1 gegen die Auflistung aller durch BASys vorhergesagten Proteinsequenzen der drei Organismen sind in Tabelle 9 ersichtlich. Zu Vergleichszwecken wurde ebenfalls aufgeführt, welche der Schlüsselproteine/-gene in anderen *L. pneumophila* Stämmen und in *L. longbeachae* vorkommen. Diese Informationen stammen aus KEGG [KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011]. Die in der Tabelle mit „ja“ (grün unterlegt) gekennzeichneten Proteine werden mit großer Wahrscheinlichkeit von der jeweiligen Spezies exprimiert. „nein“ (rot unterlegt) entspricht dem Gegenteil. Konnte ein Schlüsselprotein mittels BLASTP bei allen drei untersuchten Spezies gefunden werden, so wurde das Protein mit der wahrscheinlich größten Ähnlichkeit zu *L. pneumophila* Philadelphia 1 blau unterlegt und in Tabelle 10, welche die detaillierten Ergebnisse für diese Proteine enthält, blau umrahmt. Des Weiteren beinhaltet Tabelle 11 die BLASTP Ergebnisse der Schlüsselproteine, welche nur in einem der drei Organismen vorherbestimmt werden konnten. Zu den BLASTP Ergebnissen zählen der erreichte Gesamtscore („Total score“) des Alignments, die prozentuale Deckungsgleichheit (bezogen auf die Länge) der Abfragesequenz mit der gefundenen Zielsequenz („Query cover“), der E-Wert („e value“) und die maximale Identität („Max ident“), also die Übereinstimmung der einzelnen Aminosäuren, der beiden alignierten Sequenzen (Ähnlichkeit der beiden Sequenzen über die gesamte Deckungslänge). Die Entscheidung, bei welchem Alignment es sich um „das Beste“ handelt, hängt von den erzielten Alignmentwerten ab. Neben einem Erwartungswert, der gegen Null gehen sollte, ist auch ein vergleichsweise hoher Score entscheidend. Ebenso sollten die beiden Sequenzen möglichst deckungsgleich sein und eine hohe Ähnlichkeit haben, wobei sich diese beiden Eigenschaften im Score widerspiegeln.

Tabelle 9: BLASTP Ergebnisse

Protein	<i>L. anisa</i>	<i>L. drancourtii</i>	<i>L. shakespearei</i>	<i>L. pneumophila</i> Phila-delphia 1	<i>L. pneumophila</i> Lens	<i>L. pneumophila</i> Paris	<i>L. pneumophila</i> 2300/99 Alcoy	<i>L. pneumophila</i> Corby	<i>L. pneumophila</i> long-beachae
EnhC	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
FlaA	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein
HtpB	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
LaiA	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	nein
LegK1	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
LepA	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
LepB	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Lgt1	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Lgt2	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Lgt3	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	ja
LidA	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
LpnE	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein
LubX	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	nein	nein
LvhB2	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Mip	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
PlaA	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
RalF	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
RtxA	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	nein
SdbA	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein
SdcA	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja	ja	nein
SdhA	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
SidC	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
SidF	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	nein
SidI	nein	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
SidM	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein
VipA	nein	nein	ja	ja	ja	nein	ja	ja	ja
VipD	nein	nein	ja	ja	nein	ja	nein	nein	ja
VipE	nein	nein	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja

ja jeweiliges Schlüsselprotein konnte für diese Spezies identifiziert werden bzw. wird es laut [KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011] in den verschiedenen *L. pneumophila* Stämmen exprimiert

ja bei den zusätzlich blau unterlegten Feldern handelt es sich für das jeweilige Protein um das beste Alignment, also die größte Übereinstimmung zwischen diesem Protein der Spezies und dem Schlüsselprotein der Referenzspezies

nein jeweiliges Schlüsselprotein konnte für diese Spezies nicht identifiziert werden bzw. wird es laut [KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011] in den verschiedenen *L. pneumophila* Stämmen nicht exprimiert

Tabelle 10: Details der BLASTP Ergebnisse

Bei den blau umrahmten BLASTP Ergebnissen handelt es sich für das jeweilige Protein um das beste Alignment, also die größte Übereinstimmung zwischen diesem Protein der Spezies und dem Schlüsselprotein der Referenzspezies.

Protein	BLASTP Ergebnis	<i>L. anisa</i>	<i>L. drancourtii</i>	<i>L. shakespearei</i>
Enhc	Total score	1698	1617	1775
	Query cover	99%	99%	99%
	E value	0.0	0.0	0.0
	Max identity	67%	67%	72%
FlaA	Total score	626	626	456
	Query cover	99%	99%	99%
	E value	0.0	0.0	1,00E-160
	Max ident	70%	70%	59%
HtpB	Total score	975	979	992
	Query cover	98%	98%	96%
	E value	0.0	0.0	0.0
	Max ident	93%	94%	95%
LepA	Total score	1153	1144	1152
	Query cover	98%	98%	100%
	E value	0.0	0.0	0.0
	Max ident	93%	92%	92%
LepB	Total score	425	686	968
	Query cover	55%	99%	99%
	E value	3,00E-127	0.0	0.0
	Max ident	38%	36%	45%
LidA	Total score	268	292	387
	Query cover	87%	90%	92%
	E value	2,00E-35	9,00E-43	5,00E-57
	Max ident	50%	67%	35%

Protein	BLAST Ergebnis	<i>L. anisa</i>	<i>L. drancourtii</i>	<i>L. shakespearei</i>
LpnE	Total score	214	202	634
	Query cover	94%	96%	100%
	E value	1,00E-69	5,00E-65	0.0
	Max ident	38%	39%	82%
Mip	Total score	420	407	429
	Query cover	99%	99%	98%
	E value	2,00E-154	3,00E-149	1,00E-157
	Max ident	89%	85%	90%
PlaA	Total score	451	435	487
	Query cover	100%	99%	99%
	E value	6,00E-164	1,00E-157	3,00E-178
	Max ident	69%	67%	73%
SdhA	Total score	1118	1110	1113
	Query cover	100%	100%	100%
	E value	0.0	0.0	0.0
	Max ident	91%	90%	91%

Tabelle 11: Details der BLASTP Ergebnisse

<i>L. shakespearei</i>	Total score	Query cover	E value	Max ident
LegK1	454	98%	3,00E-158	44%
RaIF	479	97%	7,00E-173	64%
SdbA	373	51%	8,00E-93	38%
VipA	263	59%	2,00E-89	59%
VipD	594	89%	0.0	67%
VipE	344	96%	2,00E-117	67%

<i>L. drancourtii</i>	Total score	Query cover	E value	Max ident
Sidl	529	66%	2,00E-119	46%

Tabelle 12 zeigt die Schlüsselproteine von *L. anisa*, *L. drancourtii* und *L. shakespearei*, welche durch BLASTP in allen von BASys bestimmten Proteinen gefunden wurden. Alle zugehörigen BASys Genkarten der durch BLASTP identifizierten Schlüsselproteine der drei Organismen befinden sich auf der CD-ROM im Ordner *Ergebnisse\BLASTP\BASys Genkarten*. Im Ordner *Ergebnisse\BLASTP\Alignments* sind alle relevanten Proteinsequenzalignments zu finden.

Tabelle 12: BLASTP – identifizierte Proteine

<i>L. pneum. Phil. 1</i> Schlüsselprotein	<i>L. anisa</i> identifiziertes Protein	<i>L. drancourtii</i> identifiziertes Protein	<i>L. shakespearei</i> identifiziertes Protein
EnhC enhanced entry protein 1200 AS	BASYS01735 Uncharacterized protein ybeQ 1201 AS	BASYS03397 Uncharacterized protein ybeQ 1198 AS	BASYS01337 Uncharacterized protein ybeQ 1198 AS
FlaA flagellin 475 AS	BASYS01232 Flagellin 474 AS	BASYS03620 Flagellin 468 AS	BASYS00482 Flagellin 470 AS
HtpB molecular chaperone GroEL 550 AS	BASYS02995 60 kDa chaperonin 549 AS	BASYS01639 60 kDa chaperonin 549 AS	BASYS02939 60 kDa chaperonin 548 AS
LegK1 serine/threonine-protein kinase 529 AS			BASYS01589 Serine/Threonine-Protein Kinase 528 AS
LepA GTP-binding protein LepA 610 AS	BASYS00083 Elongation factor 4 oder Ribosomal back-translocase LepA 601 AS	BASYS02511 Elongation factor 4 oder Ribosomal back-translocase LepA 600 AS	BASYS00145 Elongation factor 4 oder Ribosomal back-translocase LepA 611 AS

<i>L. pneum. Phil. 1</i> Schlüsselprotein	<i>L. anisa</i> identifiziertes Protein	<i>L. drancourtii</i> identifiziertes Protein	<i>L. shakespearei</i> identifiziertes Protein
LepB hypothetical protein effector protein B 1294 AS	BASYS03791 Effector Protein B Substrate Of Dot/Icm Secretion System LepB-Like 820 AS	BASYS02061 Effector Protein B Substrate Of Dot/Icm Secretion System LepB-Like 1189 AS	BASYS02041 Effector Protein B Substrate Of Dot/Icm Secretion System LepB-Like 1142 AS
LidA effector protein LidA 729 AS	BASYS03312 Dot/Icm System Substrate Protein LidA 593 AS	BASYS01411 Dot/Icm System Substrate Protein LidA 588 AS	BASYS01661 Dot/Icm System Substrate Protein LidA 618 AS
LpnE enhanced entry protein LpnE 375 AS	BASYS00194 Uncharacterized protein ybeQ 377 AS	BASYS00656 Uncharacterized protein ybeQ 376 AS	BASYS02664 Uncharacterized protein ybeQ 376 AS
Mip macrophage infectivity potentiator 235 AS	BASYS03236 Macrophage infectivity potentiator 232 AS	BASYS00257 Macrophage infectivity potentiator 230 AS	BASYS00769 Macrophage infectivity potentiator 234 AS
PlaA (<i>L. pneum. Paris</i>) lysophospholipase A 309 AS	BASYS02917 Phosphatidylcholine- sterol acyltransferase 309 AS	BASYS01521 Phosphatidylcholine- sterol acyltransferase 308 AS	BASYS02471 Phosphatidylcholine- sterol acyltransferase 307 AS
RalF guanine nucleotide exchange protein 374 AS			BASYS01598 Hypothetical C 373 AS
SdbA effector protein SdbA 1116 AS			BASYS00329 SdbA Protein Substrate Of Dot/Icm System 685 AS
SdhA succinate dehydrogenase flavoprotein subunit A 589 AS	BASYS02737 Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 589 AS	BASYS02939 Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 589 AS	BASYS00335 Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 591 AS

<i>L. pneum. Phil. 1</i> Schlüsselprotein	<i>L. anisa</i> identifiziertes Protein	<i>L. drancourtii</i> identifiziertes Protein	<i>L. shakespearei</i> identifiziertes Protein
SidI effector protein SidI 942 AS		BASYS01023 Hypothetical Protein LLO 784 AS	
VipA VPS inhibitor protein A 352 AS			BASYS02401 Substrate Of Dot/Icm Secretion System 331 AS
VipD VPS inhibitor protein D 621 AS			BASYS00124 Patatin-Like Phospholipase 605 AS
VipE VPS inhibitor protein E 286 AS			BASYS01497 Hypothetical Protein LLO 294 AS

AS = Aminosäuren

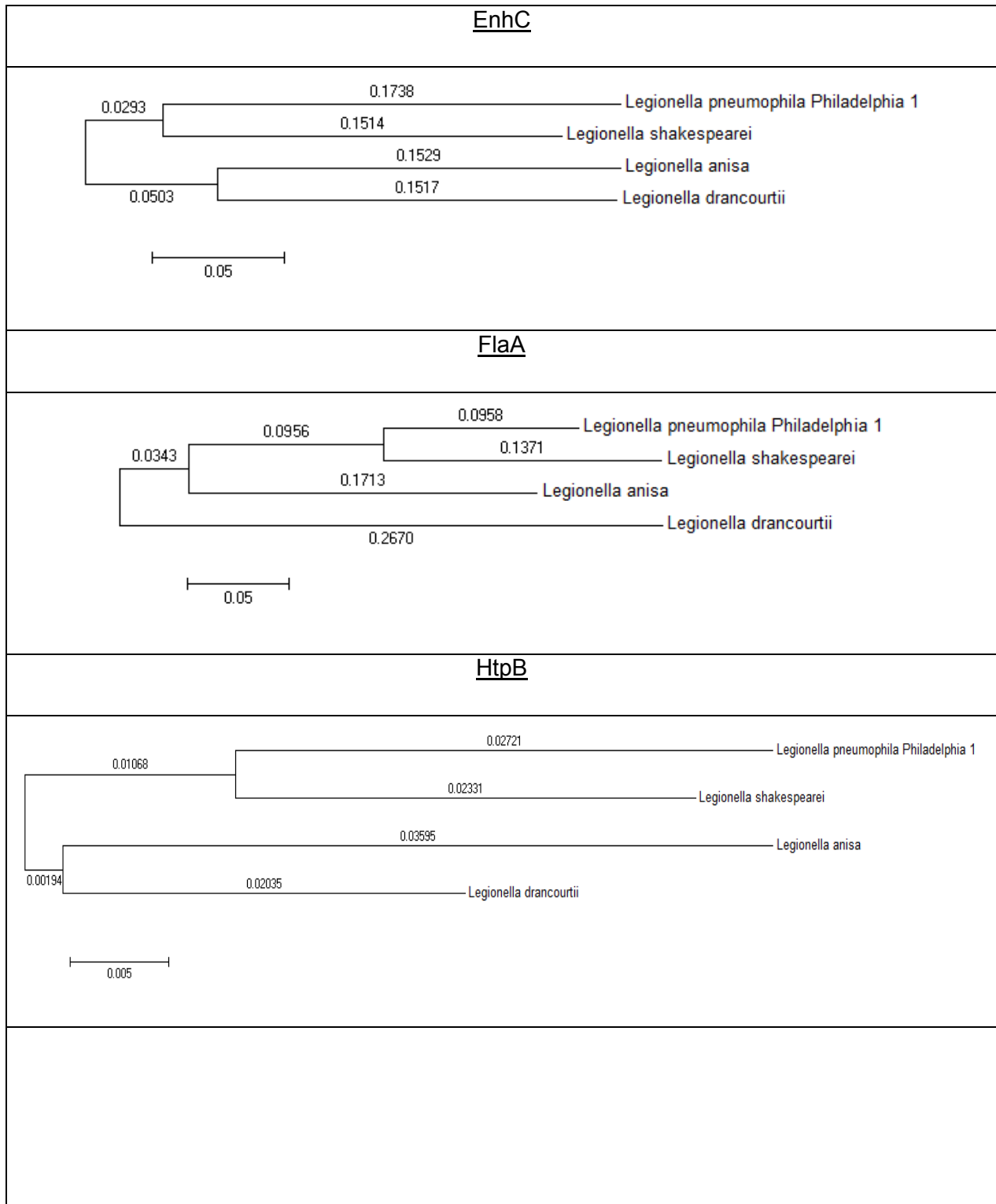
Die auf Grundlage der BLASTP Ergebnisse veränderten Pathway-Karten der Legionellose für jeden der drei Organismen *Legionella anisa str. Linanissette*, *Legionella drancourtii str. LLAP12* und *Legionella shakespearei DSM 23087* sind im Anlagenteil 3 in den Abbildungen 27, 28 und 29 dargestellt und auf der CD-ROM im Ordner *Ergebnisse\Legionellose Pathways* zu finden.

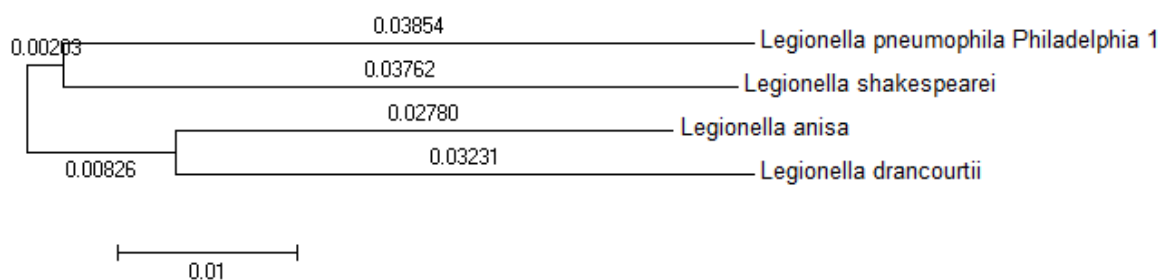
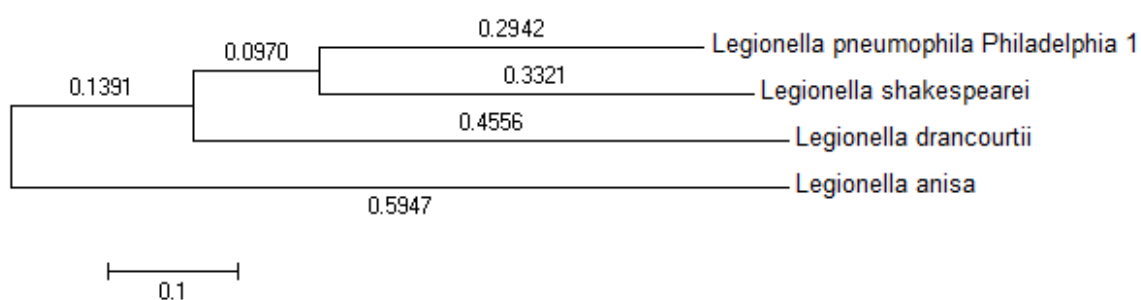
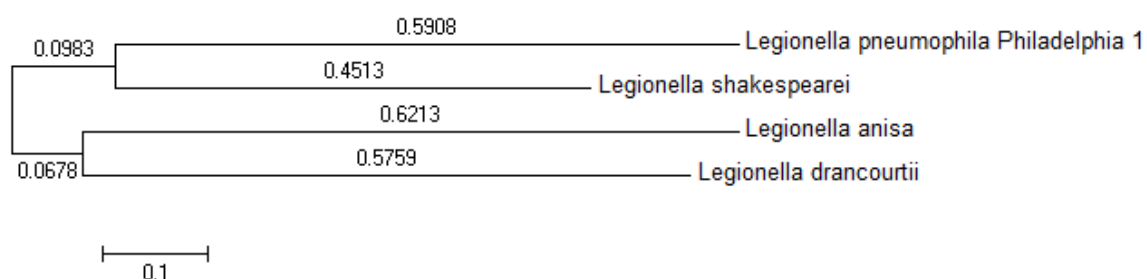
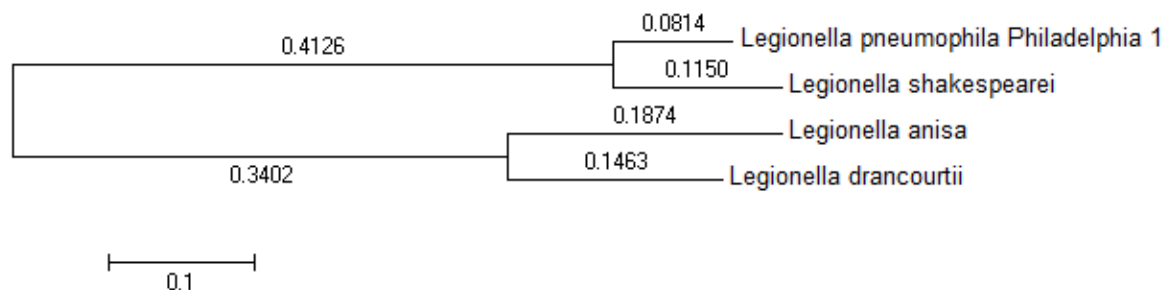
4.5 Mega 5 mit ClustalW

Für die Schlüsselproteine, welche mittels BLASTP bei allen drei untersuchten Spezies gefunden werden konnten, wurden in Mega 5 unter Verwendung von ClustalW und der Neighbor-Joining Methode phylogenetische Bäume erzeugt (Tab. 13). Die Kantenlängen der Bäume entsprechen dabei der Anzahl der Mutationen während der Evolution bzw. der geschätzten Zeit dafür. Anhand der Kantenlängen der einzelnen

Schlüsselproteine lässt sich erkennen, dass sie die Spezies in den jeweiligen Proteinen unterschiedlich stark unterscheiden.

Tabelle 13: Phylogenetische Bäume einiger Schlüsselproteine



LepALepBLidALpnE

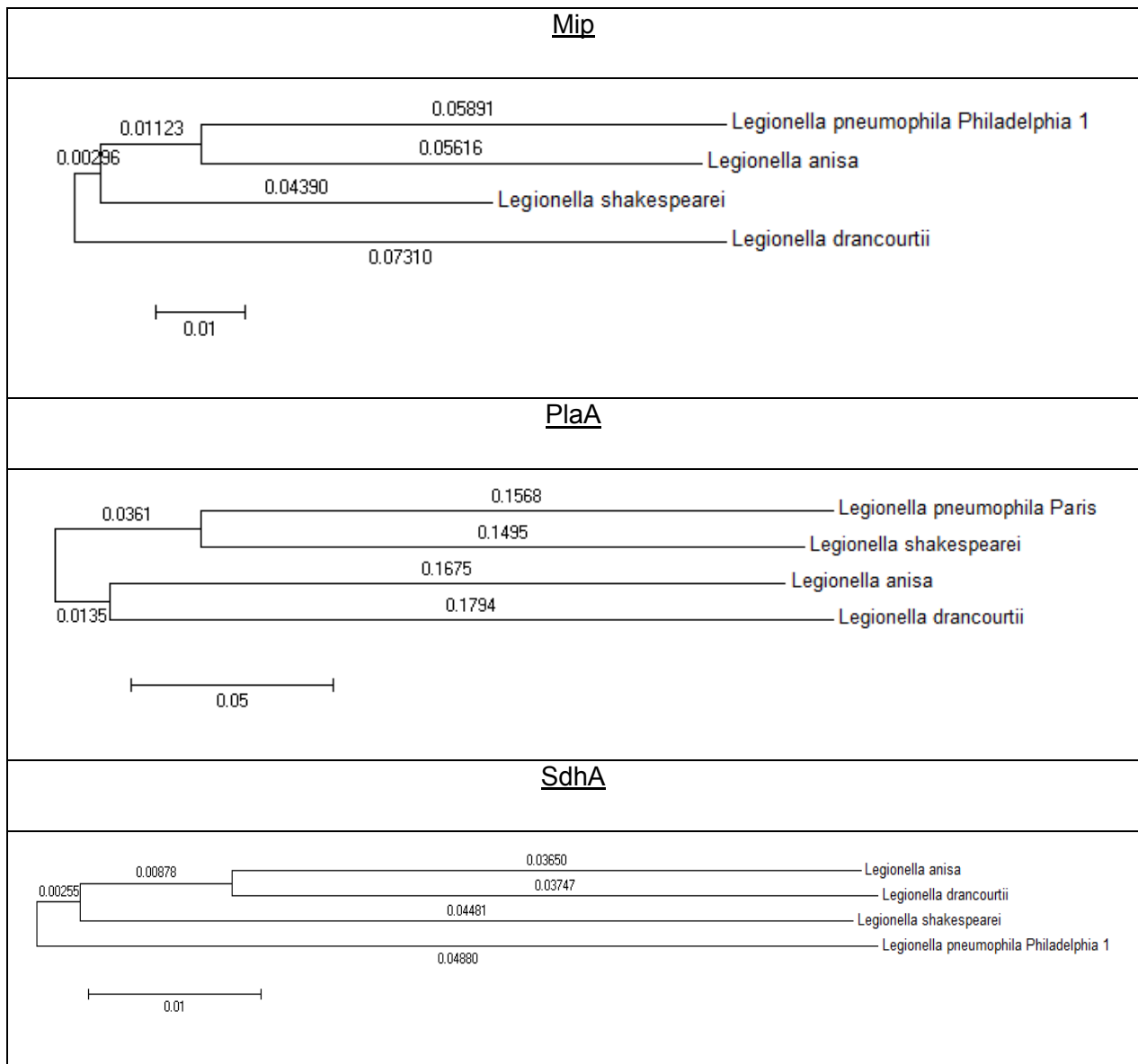


Abbildung 23 zeigt als Beispiel zwei Ausschnitte der mit Mega 5 unter der Verwendung von ClustalW erzeugten MSA. Es lässt sich sehr gut erkennen, dass bei dem Protein SdhA nahezu alle Aminosäuren der vier Sequenzen übereinstimmen. Dies spiegelt sich auch in den phylogenetischen Bäumen (siehe Tab. 13) und im Score und E-Wert der BLASTP Ergebnisse wieder (siehe SdhA, Tab. 10, S. 57). Die Kantenlängen der Bäume sind sehr klein und deuten auf einen hohen Verwandtschaftsgrad hin. Bei LpnE unterscheiden sich die verschieden farblich gekennzeichneten Aminosäuren der vier Sequenzen deutlicher. Auffällig ist auch die auftretende Ähnlichkeit zwischen den Paaren *L. pneumophila* Philadelphia 1 und *L. shakespearei*, sowie *L. anisa* und *L. drancourtii*. Diese findet sich in fast allen phylogenetischen Bäumen wieder.

SdhA

[illegible]

LpnE

Species/Abbrv						*										*	*		*	*		*	*								
1. Legionella pneumophila Philadelphia 1	M	D	M	V	I	L	L	L	V	I	A	T	A	T	G	E	F	A	C	G	V	A	F	I	L	L	S	P	A		
2. Legionella shakespearei	M	D	M	V	I	L	L	L	V	I	A	T	A	T	G	E	F	A	C	G	V	A	F	I	L	L	S	P	A		
3. Legionella anisa	---	---	M	S	L	I	L	A	L	L	V	M	A	F	A	C	G	E	F	A	C	G	V	A	F	I	L	L	S	P	A
4. Legionella drancourtii	---	---	M	S	L	I	L	A	L	L	V	M	A	F	A	C	G	E	F	A	C	G	V	A	F	I	L	L	S	P	A

Abbildung 23: Auszug des Multiplen Sequenzalignments von SdhA und LpnE

Dargestellt ist je ein Auszug aus dem durch Mega 5 unter der Verwendung von ClustalW erzeugten Multiplen Sequenzalignments für die Schlüsselproteine SdhA und LpnE. Die verschiedenen Farben markieren die einzelnen Aminosäuren nach bestimmten definierten Eigenschaften. Die Sterne in der ersten Zeile geben an, dass an dieser Stelle alle Aminosäuren der vier Sequenzen übereinstimmen.

5 Auswertung und Diskussion

In diesem Kapitel sollen die gewonnenen Ergebnisse ausgewertet und deren Bedeutung diskutiert werden. Zusätzlich wird auf die Bedeutung der Ergebnisse für das Krankheitsbild der Legionellose eingegangen und mögliche Schlussfolgerungen für die einzelnen Spezies gezogen.

5.1 *in vitro*-Kultivierung von Legionellen

Die Kultivierungsversuche mit der Spezies *Legionella pneumophila* ATCC 33152 in verschiedenen Wasserbecken sollten ursprünglich Hauptbestandteil der Masterarbeit sein. Ziel war es, durch genaueste Versuche Informationen über das Verhalten der Legionellen bei bestimmten Temperaturen und sonstigen Gegebenheiten, wie beispielsweise Kontinuität der Zirkulation, zu erhalten, d.h. wie schnell vermehren sie sich oder sterben ab.

Die unter Kapitel 4.1 in Tabelle 7 und Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine Kultivierung der Legionellen nicht möglich war. Weder in geschlossenen Systemen (Glasflaschen) mit oder ohne Sauerstoffzufuhr mit gleichzeitigem Schwenken, noch direkt im Wasserbad mit dauerhafter Zirkulation und Frischwasserzufuhr konnte ein Anstieg der Legionellenzahlen erreicht werden.

Ein Problem, welches sich bei der Kultivierung mit Sauerstoffzufuhr ergab, war zudem eine Kontamination mit Luftkeimen. Die in Abbildung 19 (siehe S. 51) dargestellte Bi-Plate zeigt die Überprüfung von isolierten Kolonien aus dem Versuch der direkten Kultivierung der Legionellen im Wasserbecken. Es ist zu erkennen, dass es sich nur bei einer Kolonie um Legionellen handelt (in der Mitte: Kolonie ist nicht auf der Seite ohne Cystein gewachsen). Alle anderen Bakterienstämme wurden höchstwahrscheinlich über die Luft in das Wasserbecken eingetragen.

Der Grund für das Absterben der Legionellen ist ihre Eigenheit sich ausschließlich intrazellulär in Wirtsorganismen zu vermehren. Im Wasser geschieht dies in Amöben und anderen Protozoen. Diese Eigenschaft scheint auch die Ursache für die Fähigkeit der Legionellen, eine Pneumonie auszulösen, zu sein. Da an dieser Stelle, mit den gewonnenen Ergebnissen nicht weiter gearbeitet werden konnte und sich die Frage stellte, ob die Eigenschaft der intrazellulären Vermehrung bei allen Legionellen Spezies auftritt, von welchen Genen/Proteinen diese abhängt und in welchem Zusammenhang sie zur Auslösung der Legionellose steht, wurde die Fragestellung der Masterarbeit auf die Sequenzanalyse der Schlüsselproteine dreier spezieller *Legionella* Spezies gelenkt.

5.2 Sequenzanalyse der Schlüsselproteine

Alle hier diskutierten Ergebnisse beziehen sich auf die Kapitel 4.2 bis 4.5 dieser Arbeit. Die Aussagen, in denen die Rede von einer Expressierung bestimmter Proteine durch eine Spezies ist, beruhen ausschließlich auf den hier gewonnenen Ergebnissen durch die Genomsequenzanalysen und nicht auf experimentellen Versuchsergebnissen.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse der drei Genome von *Legionella anisa* str. *Linanissette*, *Legionella drancourtii* str. *LLAP12* und *Legionella shakespearei* DSM 23087 geben an, wie viele der Schlüsselproteine der Legionellose jeder der drei Organismen vermutlich besitzt. Um zunächst eine Aussage über die Qualität der von BASys vorherbestimmten Gene und der daraus übersetzten Proteinsequenzen treffen zu können, wurde zusätzlich die Genomsequenz von *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia 1 [NCBI: L.P. PHIL. GENOMSEQUENZ.] ebenfalls durch BASys mit der Nutzung der Gentabelle aus GeneMark annotiert. Die Sequenzen der Schlüsselproteine von *L. pneumophila* Philadelphia 1 der KEGG Legionellose Map wurden mittels BLASTP gegen alle resultierenden Proteinsequenzen der 3108 Gene der BASys Annotation aligniert. Tabelle 14 zeigt, dass in nahezu allen Fällen ein paarweises Alignment mit (fast) 100%-iger Übereinstimmung in Länge und Identität gefunden wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die Genvorhersage durch BASys unter Verwendung der Gentabelle, welche durch GeneMark anhand der vollständigen Genomsequenz der Spezies generiert wurde, sehr zuverlässig und qualitativ

hochwertig ist. Es ist also davon auszugehen, dass auch die Gene und Proteine der drei Zielspezies mit hoher Genauigkeit richtig vorherbestimmt wurden. Allerdings sind bei dieser Überprüfung auch zwei Fehler aufgetreten, welche in der Tabelle blau markiert sind. Bei den Proteinen Mip und RalF konnte mittels BLASTP gegen die Proteinsequenzen von BASys keine Übereinstimmung gefunden werden, während bei der Alignierung gegen die Proteinsequenzen, welche von GeneMark übermittelt wurden, ein sehr gute Übereinstimmung gefunden wurde. Es ist also zu vermuten, dass BASys eventuell einige der Schlüsselproteine der drei Zielspezies nicht richtig übermittelt hat und diese so nicht mittels BLASTP identifiziert werden konnten.

Tabelle 14: BLASTP Ergebnisse von *L. pneumophila* Philadelphia 1

Protein	vorherbest. Protein	Total score	Query cover	E value	Max ident
EnhC	BASYS02723 Uncharacterized protein ybeQ	2428	100%	0.0	100%
FlaA	BASYS01372 Flagellin	904	100%	0.0	100%
HtpB	BASYS00685 60 kDa chaperonin	1103	100%	0.0	100%
LaiA	BASYS02212 Hypothetical Protein LPC	3111	99%	0.0	100%
LegK1	BASYS01519 Serine/Threonine-Protein Kinase	1093	100%	0.0	100%
LepA	BASYS01910 Elongation factor 4	1250	100%	0.0	100%
LepB	BASYS02561 Effector Protein B	2606	100%	0.0	100%
Lgt1	BASYS01400 Hypothetical Protein LLO	1093	100%	0.0	100%
Lgt2	BASYS01524 Hypothetical Protein Lpl	1773	100%	0.0	100%
Lgt3	BASYS02947 Hypothetical Protein Lpl	1315	100%	0.0	100%
LidA	BASYS00942 Dot/Icm System Substrate Protein LidA	1478	100%	0.0	100%
LpnE	BASYS02275 Uncharacterized protein ybeQ	744	100%	0.0	100%
LubX	BASYS02915 E3 ubiquitin-protein ligase LubX	496	97%	0.0	100%

Protein	vorherbest. Protein	Total score	Query cover	E value	Max ident
LvhB2	BASYS01283 Hypothetical Protein Lpp	149	92%	2,00E-52	83%
Mip	nur in Proteintabelle von GeneMark gefunden	473	99%	3,00E-175	100%
PlaA	BASYS02400 Phosphatidylcholine- sterol acyltransferase	637	100%	0.0	99%
RalF	nur in Proteintabelle von GeneMark gefunden	767	100%	0.0	100%
RtxA	BASYS02590 UPF0135 protein BH1380	219	85%	2,00E-79	100%
SdbA	BASYS00283 Hypothetical Protein PUV	2331	100%	0.0	100%
SdcA	BASYS02585 SdcA Protein Paralog Of SidC	1862	99%	0.0	100%
SdhA	BASYS00533 Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	1228	100%	0.0	100%
SidC	BASYS02586 SdcA Protein Paralog Of SidC	1874	99%	0.0	100%
SidF	BASYS02667 Dot/Icm System Substrate Protein	1903	100%	0.0	100%
SidI	BASYS02579 Hypothetical Protein LLO	1937	100%	0.0	100%
SidM	BASYS02534 Hypothetical Protein Lpg	1327	99%	0.0	100%
VipA	BASYS00389 Substrate Of Dot/Icm Secretion System	720	100%	0.0	100%
VipD	BASYS02916 Patatin-Like Phospholipase	1266	99%	0.0	100%
VipE	BASYS02896 Hypothetical Protein LLO	588	100%	0.0	100%

Für die drei Zielspezies wurden unterschiedlich viele und verschiedene Schlüsselproteine gefunden. Tabelle 15 zeigt eine Zusammenfassung der BLASTP Ergebnisse für *L. anisa*, *L. drancourtii* und *L. shakespearei*. Es ist eindeutig zu erkennen, dass für *L. shakespearei* nicht nur die meisten Schlüsselproteine identifiziert

werden konnten, sondern diese auch noch den Proteinen der Referenzspezies am ähnlichsten waren. Die Ergebnisse von *L. anisa* und *L. drancourtii* unterscheiden sich wenig, daher kann vermutet werden, dass sich diese zwei Legionellen Spezies im Bezug auf die Schlüsselproteine der Legionellose sehr ähnlich sind. Die unter Kapitel 4.5 aufgeführten Phylogenetischen Bäume bestätigen diese Ergebnisse. Bis auf bei dem Protein Mip zeigen alle Bäume die größte Verwandtschaft zwischen den Paaren *L. pneumophila* Philadelphia 1 und *L. shakespearei*, sowie *L. anisa* und *L. drancourtii*.

Tabelle 15: Zusammenfassung der BLASTP Ergebnisse

	<i>L. anisa</i>	<i>L. drancourtii</i>	<i>L. shakespearei</i>
Anzahl identifizierter Schlüsselproteine (von 28)¹	10	11	16
Anzahl bester Alignments (von 10 Proteinen, welche bei allen 3 Spezies gefunden wurden)²	3	2	8
Anzahl Proteine, welche nur in dieser Spezies gefunden wurden (nicht in den beiden anderen)³	0	1	6

¹ Von den 28 Schlüsselproteinen wurden für die jeweilige Spezies x Proteine identifiziert, d.h. durch BLASTP in der jeweiligen Proteintabelle (von BASys) der Spezies gefunden.

² Von den 28 Schlüsselproteinen konnten 10 in allen drei Zielspezies identifiziert werden. Hier wird die Anzahl der Alignments angegeben, bei denen die jeweilige Spezies das beste Ergebnis erzielte, also dem Schlüsselprotein der Referenzspezies am ähnlichsten war.

³ Von den 28 Schlüsselproteinen wurden einige ausschließlich in einer der drei Legionellen Spezies gefunden. Hier wird die jeweilige Anzahl der Proteine angegeben, die alleine in dieser Spezies identifiziert werden konnten.

Von den 28 Schlüsselproteine konnten LaiA, Lgt1/2/3, LubX, LvhB2, RtxA, SdcA, SidC, SidF und SidM bei keiner der drei Spezies identifiziert werden. Zudem besitzen *L. anisa* und *L. drancourtii* die Proteine LegK1, RaIF, SdbA, VipA, VipD und VipE wahrscheinlich nicht. SidI konnte nur bei *L. drancourtii* ausfindig gemacht werden. Die Bedeutung des Nichtvorhandenseins der einzelnen Schlüsselproteine soll nun genauer betrachtet werden.

RtxA und LvhB2 – in keiner der drei Spezies vorhanden

Die Abwesenheit des, für den Wirtszelleintritt und die Replikation wichtigen, Proteins RtxA führt zu einer, wie bereits in den Grundlagen erwähnt, messbaren Senkung der Virulenz der Bakterien in Mäusen [CIRILLO ET AL., 2002]. Allerdings dürfte es nicht zum kompletten Verlust der Virulenz führen, denn auch die hochvirulente Spezies *Legionella longbeachae* besitzt RtxA nicht. Eine Erklärung für das Weiterbestehen aller wichtigen Mechanismen kann die Anwesenheit der anderen Proteine (EnhC, LpnE, HtpB), welche für den Zelleintritt, die Replikation und intrazelluläre Überlebensmechanismen verantwortlich sind, sein (Abb. 24). Auch das Nichtvorhandensein des Schlüsselproteins LvhB2 hat lediglich bei einer Temperatur von 30°C einen negativen Einfluss (100-fach) auf den Zelleintritt und die intrazelluläre Replikation. Bei 37°C, also Körpertemperatur, konnte kein Defekt bei der Interaktion mit Wirtszellen registriert werden, so dass das Fehlen von LvhB2 für die erfolgreiche Besiedlung der Legionellen nicht von Bedeutung ist. [RIDENOUR, 2003]

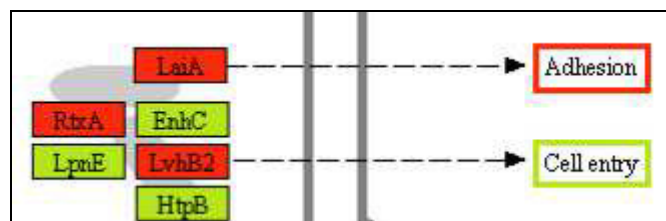


Abbildung 24: Veränderte Situation bei der Wirtszellinvasion

Abbildung abgeleitet von der Original Legionellose Karte der KEGG Datenbank.
 grün: exprimierte Proteine/aktivierte Pathways; rot: nicht exprimierte Proteine/inaktivierte Pathways [modifiziert nach KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011]

LaiA – in keiner der drei Spezies vorhanden

Die Abwesenheit des Adhäsionsproteins LaiA (siehe Abb. 24) deutet auf eine geringere Mortalität hin, denn Versuche ergaben, dass *laiA*-Mutanten aus den Lungen isoliert wurden. [CHANG ET AL., 2005] Aber auch hier tritt der Fall ein, dass *L. longbeachae* das Protein ebenfalls nicht besitzt und dennoch in Australien und Neuseeland fast 50% aller Legionellosefälle auslöst. Eine strikte Widerlegung der Pathogenität der drei Zielspezies liegt mit der Abwesenheit von LaiA deshalb nicht vor.

SidC, SidM – in keiner der drei Spezies vorhanden & VipA, VipD, VipE und RalF – nicht vorhanden in *L. anisa* und *L. drancourtii*

Werden SidC und SidM, die unter anderen für die Rekrutierung von Wirtszellbestandteilen verantwortlich sind, nicht von einer Legionellen Spezies exprimiert, dann können sich die Bakterien in der veränderten Vakuole schlechter replizieren. Sind zudem noch, wie im Falle von *L. anisa* und *L. drancourtii* auch die Proteine VipA, VipD, VipE und RalF nicht vorhanden, welche die Lysosomenfusion verhindern und die Wirts-GTPase Arf1 rekrutieren, ist eine funktionierende Remodellierung der LCV fast undenkbar (Abb. 25). Da allerdings nachgewiesen ist, dass zumindest *L. anisa* in der Lage ist eine Legionellose auszulösen [FALLON, STACK, 1990] und dafür die Neugestaltung der LCV unabdingbar ist, muss die Spezies irgendwie in der Lage sein, diese Mechanismen auszuführen. Zum einen ist bekannt, dass das Schlüsselprotein LpnE, welches in allen drei Spezies identifiziert werden konnte, eine Rolle in der Unterbindung der Lysosomenfusion spielt. Dadurch könnte LpnE in den drei Organismen eventuell die Aufgabe der fehlenden Proteine VipA, VipD und VipE übernehmen. Eine weitere Vermutung wäre, dass alle Vorgänge über das Schlüsselprotein LidA realisiert werden, dessen Funktion ohnehin noch nicht geklärt ist. Durch die Aktivierung von Rab1 und der Verankerung von LidA über PI(4)P an die Membran der LCV können die Wirtszellproteine Sec22b, Sar1 und Cdc48/p97 möglicherweise dennoch rekrutiert werden und zur Neugestaltung der LCV führen. Wie allerdings eine Inhibierung der Lysosomenfusion ohne die drei Proteine VipA, VipD und VipE funktionieren könnte, bleibt unklar. Die Möglichkeit, dass der Fehler an dieser Stelle bei der Vorherbestimmung der Gene/Proteine mittels BASys liegt, ist natürlich nicht auszuschließen. Ursachen könnten beispielsweise Frameshift Fehler sein.

Bei der Spezies *L. shakespearei*, bei der VipA/D/E und RalF exprimiert werden, findet die Remodellierung der Vakuole mit hoher Wahrscheinlichkeit statt (siehe Abb. 30, Anlagen Teil 3).

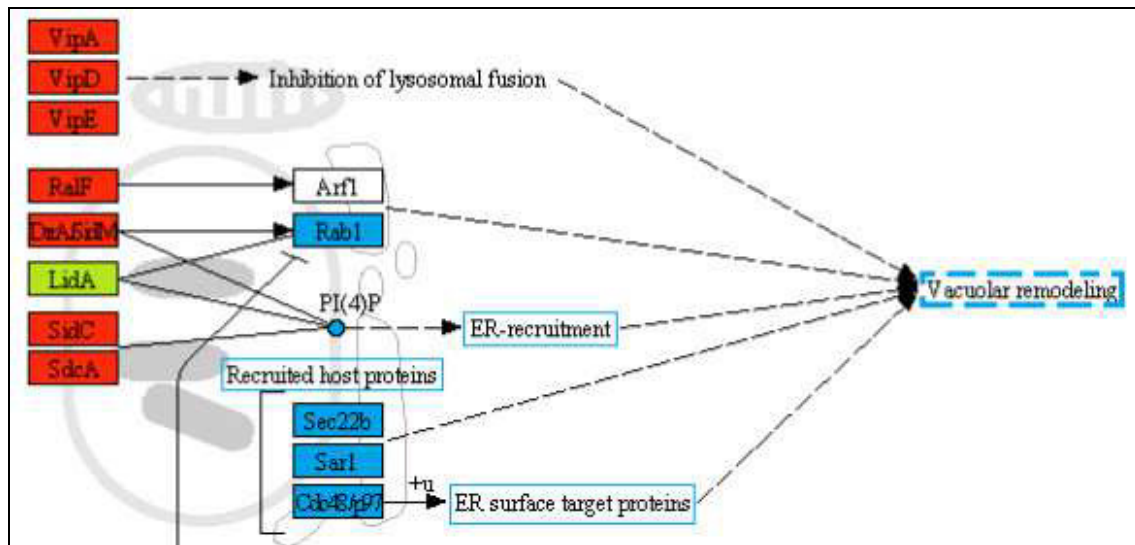


Abbildung 25: Veränderte Situation bei der Vakuolenneugestaltung

Abbildung abgeleitet von der Original Legionellose Karte der KEGG Datenbank.

grün: exprimiertes Protein der drei Zielspezies; rot: nicht exprimierte Proteine, durch welche die Pathways nicht aktiviert werden können; blau: humane aktivierte/beeinflusste Proteine/Pathways (vom exprimierten Protein ausgehend)

[modifiziert nach KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011]

SidF, LubX – in keiner der drei Spezies vorhanden & LegK1, SdbA – nicht vorhanden in *L. anisa* und *L. drancourtii*

Die Schlüsselpoteine SidF, LegK1 und SdbA haben im Grunde genommen alle dieselbe Funktion wie das in den beiden Spezies exprimierte SdhA, nämlich die Verhinderung des programmierten Zelltods (Abb. 26). Dies würde bedeuten, dass die Apoptose durch die Anwesenheit von SdhA dennoch inhibiert werden müsste. Besser funktioniert dies natürlich, wenn alle Proteine vorhanden sind. Bei *L. shakespearei* fehlt immerhin nur SidF (siehe Abb. 30, Anlagen Teil 3). LubX, welches in allen 3 Spezies nicht identifiziert werden konnte, ist für die Inhibierung der Clk Kinase verantwortlich. Dies führt zu einer Reduktion des Legionellenwachstums in den Alveolarmakrophagen, was bedeutet, wenn LubX in den drei Zielorganismen nicht exprimiert wird, müsste ein verbessertes Legionellenwachstum gegenüber *Legionella pneumophila* Philadelphia 1 stattfinden. Allerdings kann sich dies in Bezug auf Nährstoff- und Platzangebot auch negativ auswirken, wenn es zu einem schnellen Wachstum der Legionellen kommt.

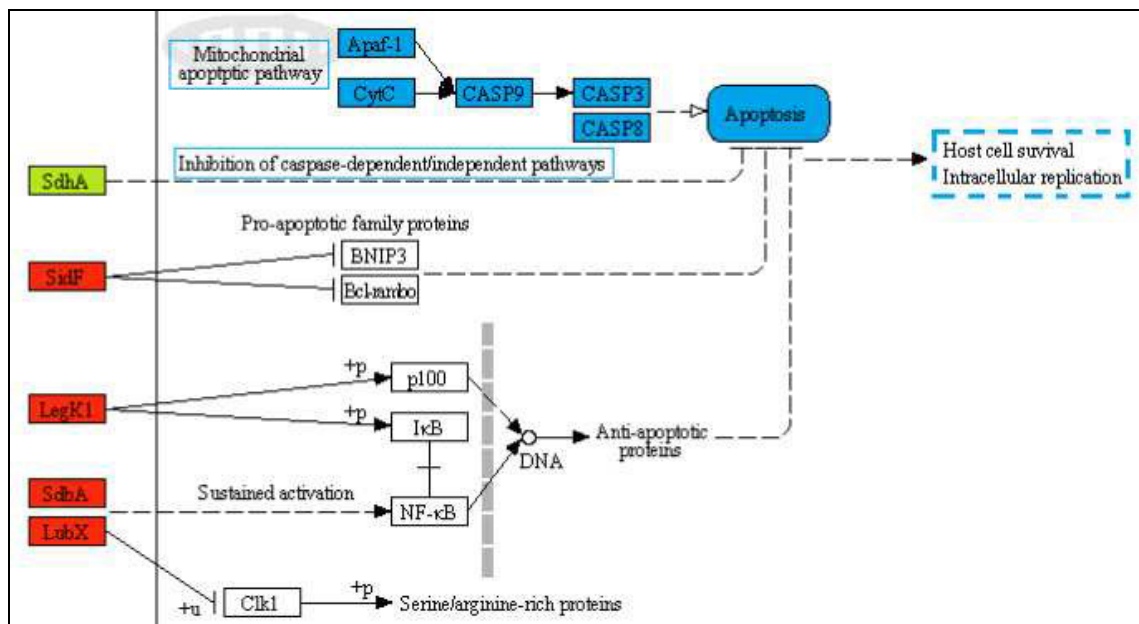


Abbildung 26: Auswirkungen auf die Apoptose und das intrazelluläre Wachstum

Abbildung abgeleitet von der Original Legionellose Karte der KEGG Datenbank.
 grün: exprimierte Protein der drei Zielspezies; rot: nicht exprimierte Proteine, durch welche die Pathways nicht aktiviert werden können; blau: humane aktivierte/beeinflusste Proteine/Pathways (vom exprimierten Protein ausgehend)
 [modifiziert nach KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011]

Lgt1/2/3 – in keiner der drei Spezies vorhanden & SidI– nicht vorhanden in *L. anisa* und *L. shakespearei*

Das Nichtvorhandensein von Lgt1/2/3 und SidI bei den beiden Spezies *L. anisa* und *L. shakespearei* führt dazu, dass zum Einen die intrazelluläre Replikation der Legionellen nicht weiter gefördert wird und zum Anderen der von den Legionellen ab einem bestimmten Zeitpunkt gewünschte Wirtszelltod nicht gefördert wird (Abb. 27). Allerdings führt zu diesem auch das Protein FlaA, welches bei allen drei Organismen vorhanden ist. Die intrazelluläre Vermehrung wird während dessen auch in anderen Bereichen des Legionellose Pathways gesichert. Die ebenfalls in den drei Zielspezies vorhandenen Schlüsselproteine LepA und LepB sorgen dafür, dass die Legionellen, wenn sie sich durch FlaA in ihre virulente Form umgewandelt haben, aus den Wirtszellen entlassen werden ohne sie dabei zu zerstören.

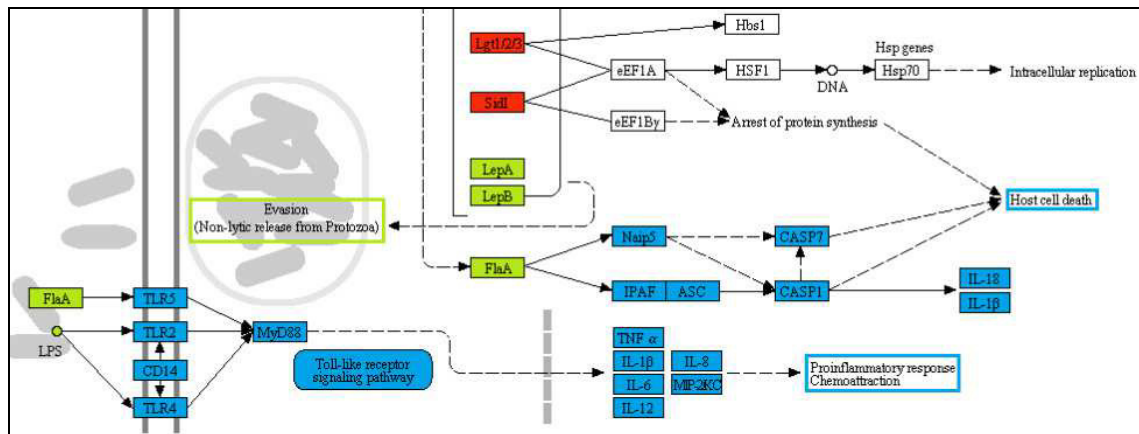


Abbildung 27: Veränderung bei der Replikation und dem Wirtszelltod

Abbildung abgeleitet von der Original Legionellose Karte der KEGG Datenbank.
 grün: exprimierte Proteine der drei Zielspezies; rot: nicht exprimierte Proteine, durch welche die Pathways nicht aktiviert werden können; blau: humane aktivierte/beeinflusste Proteine/Pathways (vom exprimierten Protein ausgehend)
 [modifiziert nach KEGG: LEGIONELLOSIS, 2011]

Ebenfalls in den drei Spezies *L. anisa*, *L. drancourtii* und *L. shakespearei* identifiziert werden konnten die Proteine Mip und PlaA. Damit ist sowohl die Aufnahme der Bakterien in die Zellen, deren optimale Vermehrung in den Alveolarmakrophagen als auch deren Schutz vor der zytolytischen Aktivität der Wirtszellen gesichert.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Sequenzanalysen sagen, dass alle drei Spezies in der Lage sind eine Legionellose auszulösen. Dies lässt sich ebenfalls in den veränderten Legionellose Pathway Karten im Anlagen Teil 3 erkennen. Bei allen drei Spezies werden alle wichtigen Punkte mit den vorherbestimmten vorhandenen Proteinen der Legionellose erreicht. Die Vermutung liegt allerdings nahe, dass eine verschiedene Anzahl von Proteinen auf eine unterschiedlich starke Virulenz hindeutet. Sollte dies der Fall sein, ist anzunehmen, dass *L. shakespearei* pathogener ist als *L. anisa* und *L. drancourtii*. Um eine entgültige Aussage über die Pathogenität der Spezies *L. drancourtii* und *L. shakespearei* treffen zu können, müssen Versuche im Labor durchgeführt werden, beispielsweise an Zellkulturen oder Modellorganismen.

6 Ausblick

Diese Arbeit zeigt die Bedeutung der Bioinformatik für die Molekularbiologie, denn mit den gewonnenen Erkenntnissen kann gezielter an eine laborpraktische Arbeit herangegangen werden. Für eine Weiterführung dieses Projektes sollten zunächst, auf Grund der festgestellten Diskrepanzen zwischen den übermittelten Proteinsequenzen von GeneMark und BASys, alle BLASTP Alignments der Schlüsselproteine erneut mit den Proteinsequenzen von GeneMark durchgeführt werden. So kann ausgeschlossen werden, dass einige der Proteine eventuell übersehen wurden und doch von den Spezies exprimiert werden. Des Weiteren ist es für eine Fortführung von großer Bedeutung die erzielten Ergebnisse im Labor nachzuprüfen. So könnten beispielsweise mittels Expressionsexperimenten die Anwesenheit der Schlüsselgene und –proteine in den einzelnen Spezies überprüft werden. Von Vorteil ist dafür auch das durch diese Arbeit erzielte Wissen über die Sequenzen der Schlüsselgene und –proteine. Des Weiteren könnte man, wie das bereits bei *Legionella pneumophila* getan wurde, direkt in Modellorganismen wie Mäusen oder in Zellkulturen von Alveolarmakrophagen untersuchen, ob die drei Legionellen Spezies in der Lage sind den Organismus zu infizieren bzw. die Makrophagen zu befallen und sie in ihnen zu replizieren.

Glossar

Aerosol

Ein Aerosol entsteht durch die Vermischung eines festen oder flüssigen Schwebeteilchens mit einem Gas.

Adhesion

= Adhäsion, die Anhaftung von Bakterien an Wirtszelloberflächen oder ähnlichem zu Beginn einer Infektion

Anti-apoptotic proteins

= anti-apoptotische Proteine, unterdrücken die Apoptose

Arrest of proteins synthesis

= Hemmung/Aufhalten der Proteinsynthese

Apoptosis = Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, welche aufgrund zellinterner Prozesse ausgelöst oder von außen angeregt werden kann.

Aufbau der Lungenbläschen (siehe Abb. 4)

Die Alveolen (Lungenbläschen) sind im Durchmesser je nach Zustand (Ein- und Ausatmung) zwischen 50 und 250 µm groß. Im Inneren befindet sich der Alveolarraum. Zwischen den benachbarten Lungenbläschen befinden sich schmale Alveolarsepten, welche zur Innenseite eine Monolipidschicht besitzen und lumenseitig zum Kapillarlumen hin mit den sogenannten Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) ausgekleidet sind. Man unterscheidet hier zwischen flachen und kubischen Alveolarepithelzellen. Die Pneumozyten Typ I (flach) sind teilweise dünner als 0,1 µm. Die Pneumozyten Typ II (kubisch) sind die Produzenten des Surfactants (Lipidschicht).

Cell entry

= Zelleintritt

Chemoattraction

= Chemoattraktion, Anziehungskraft von bestimmten Hilfssubstanzen auf geschädigte Zellen

Complement and coagulation cascades

= Kaskaden der Gerinnung und Vervollständigung

ER-recruitment

= Rekrutierung von Vesikeln des Endoplasmatischen Retikulums

ER surface target proteins

= Oberflächenzielproteine des ER

Evasion

= das Ausweichen/ die Freisetzung

Host cell survival/ death

= Überleben/ Tod der Wirtszelle

In vitro

= im Glas

Inhibition of lysosomal fusion

= Inhibierung der Lysosomenfusion

Interstitium

= Zwischenraum

Intracellular replication

= Intrazelluläre Replikation

Mitochondrial apoptotic pathway

= mitochondrialer apoptotischer Pathway

Mykotisches Aneurysma

Ein Aneurysma ist eine ballonförmige Erweiterung eines Blutgefäßes, die jedes Gefäß im Körper betreffen kann. Mykotische (Pilz-) Aneurysmen sind im Aortenbereich sehr selten, sie liegen unter 1%. Erreger sind praktisch nie Pilze, sondern Bakterien. Der Name mykotisches Aneurysma beschreibt das pilzartige Aussehen der Aneurysmawand. [THORAKALE AORTENANEURYSMEN]

Phagocytosis

= Phagozytose, ist die Aufnahme von Partikeln in eine eukaryontische Zelle, die auf die intrazelluläre Verdauung spezialisiert sind

Pro-apoptotic family proteins

= pro-apoptotische Familienproteine

Proinflammatory response

= entzündungsfördernde (Immun)Antwort

Recruited host proteins

= Rekrutierte Wirtszellproteine

Respirationstrakt

= Atemtrakt

Serine/arginine-rich proteins

= Serien/Arginin-reiche Proteine

Serogruppe

Serogruppen dienen der Einteilung von Bakterien oder Viren nach den auf ihrer Oberfläche befindlichen Antigenen. Ein bestimmter Serotyp kann also mit Hilfe serologischer Tests von anderen Serotypen innerhalb einer Subspezies unterschieden werden.

Sustained activation

= anhaltende Aktivierung

Taxonomie

Die Taxonomie ist ein einheitliches Verfahren zur Klassifizierung von bestimmten Objekten; in der Biologie von Lebewesen. Die Stufen der biologischen Taxonomie sind (von groß nach klein): Reich, Stamm, Unterstamm, Klasse, Ordnung, Überfamilie, Familie, Unterfamilie, Gattung (Genus), Art (Species), Unterart (Subspecies). Die Legionellen sind eine Gattung und gehören zur Familie der *Legionellaceae*, Ordnung der *Legionellales*, Klasse der Gammaproteobakterien, Stamm der Proteobakterien und dem Reich der Bakterien. *L. pneumophila* ist eine Art und *L. pneumophila Philadelphia 1* eine Unterart.

Toll-like receptor signaling pathway

= Toll-like Rezeptor Signaltransduktionsweg, ist der Signalweg, welcher über eine Struktur des angeborenen Abwehrsystems ausgelöst wird

ubiquitär

= allgegenwärtig

Vacuolar remodelling

= Neugestaltung/Remodellierung der Vakuole

Literatur

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMANN DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403–420

APWEILER R, BAIROCH A, WU CH, BARKER WC, BOECKMANN B, FERRO S, GASTEIGER E, HUANG H, LOPEZ R, MAGRANE M, ET AL. (2004) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, 32, D115–D119.

ARAGON V, KURTZ S, FLIEGER A ET AL. (2000) Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD-deficient *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 68:1855–1863

BANGSBORG JM (1997) Antigenic and genetic characterization of *Legionella* proteins: contributions to taxonomy, diagnosis and pathogenesis. *APMIS Supplementum*: 70(105):1-53

BEHLING G, FLUGS Fachinformationsdienst, GSF-Forschungszentrum (2004) Legionellenproblematik im Trinkwasser. URL: <http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/FLUGS/PDF/Themen/Krankheitsbilder/Legionellen.pdf>, verfügbar am 26.04.2013

BESEMER J, BORODOVSKY M (1999) Heuristic approach to deriving models for gene finding. *Nucleic Acids Res.*, 27, 3911-3920.

BESEMER J, LOMSADE A, BORODOVSKY M (2001) GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acid Res.*, 29, 2607-2618.

BIBB, WF, ARNOW, PM, DELLINGER, DL, PERRYMAN, SR (1983) Isolation and characterization of a seventh serogroup of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 17, 346-348.

BRENNER DJ, STEIGERWALT AG, MCDADE JE (1979) Classification of the legionaire's disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann.Intern.Med*;90:656-658

BRIELAND JK, FANTONE JC, REMICK DG ET AL. (1997) The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infect Immun* 65:5330–5333

CHANG B, KURA F, AMEMURA-MAEKAWA J, KOIZUMI N, WATANABE H (2005) Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* 73(7):4272-80.

CIRILLO SLG, YAN L, LITTMAN M, SAMRAKANDI MM, CIRILLO JD (2002) Role of the *Legionella pneumophila rtxA* gene in amoebae. *Microbiology* June 2002, vol. 148, no. 6:1667-1677

DEN BOER JW, YZERMAN EP, SCHELLEKENS J, LETTINGA KD, BOSHUIZEN HC, VAN STEENBERGEN JE, BOSMAN A, VAN DEN HOF S, VAN VLIET HA, PEETERS MF, VAN KETEL RJ, SPEELMAN P, KOOL JL, CONYN-VAN SPAENDONCK MA (1999) A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (1): 37 – 43

DVGW-ARBEITSBLATT W 551 "Trinkwassererwärmungs- und Trinkwasserleitungsanlagen; Technische Maßnahmen zur Verminderung des Legionellenwachstums; Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasser-Installationen". URL: <http://www.dvgw.de/?id=95>, verfügbar am 01.07.2013

EPA (1985) *Legionella* Criteria Document. United States Environmental Protection Agency, Office of Water. Washington, DC

EPA (1999) *LEGIONELLA: HUMAN HEALTH CRITERIA DOCUMENT* Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. EPA-822-R-99-001. URL: www.epa.gov, verfügbar am 01.07.2013

FALLON RJ, STACK BHR (1990) Legionnaires' disease due to *Legionella anisa*. *Journal of Infection* 20: 227-229

FANG GD, FINE M, ORLOFF J ET. AL (1990) New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine Baltimore* 69:307–316

FIELDS et al. (2002): *Legionella* and Legionnaire's Disease: 25 Years of Investigation; *Clin Microbiol Rev.* July 2002: 506-526

FLIEGER A, BANERJI S, BROICH M, RYDZEWSKI K, SHADRACH WS (2003) Pathogenese der Legionelleninfektion. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz* – 46:694-699

FLIEGER A, GONG S, FAIGLE M ET AL. (2001) Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*. J Bacteriol 183:2121–2124

GEORGIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY, USA: GENEMARK.HMM. URL:
<http://exon.biology.gatech.edu/background.html>, verfügbar am 19.08.2011

GORMAN GW, FEELEY JC, STEIGERWALT A, EDELSTEIN PH, MOSS CW, BRENNER DJ (1984) *Legionella anisa*: a New Species of *Legionella* Isolated from Potable Waters and a Cooling Tower. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 49, No. 2: 305-309

GREEN ED (2001) Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Nature Reviews Genetics*, 2, 573-583.

HALES LM, SHUMAN HA (1999) *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. Infect Immun 67:3662–3666

HUTTER, BARBARA: ANWENDUNGEN VON NEXT GENERATION SEQUENCING TEIL 3: ASSEMBLIERUNG. URL:
http://ibios.dkfz.de/ibios_old/lectures/bioinf_ws1011/bbrors/bioinf-I_1011_seq8.pdf,
verfügbar am 21.07.2011

INFEKTIONSSCHUTZGESETZ. URL: <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/ifsg/gesamt.pdf>, verfügbar am 14.08.2013

KEGG: LEGIONELLOSIS (2011) BY KANEHISA LABORATORIES. URL:
http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map05134, verfügbar am 25.07.2013

KORTSIK C u. a.: Grundlagen Der Zytopathologie: Kurzlehrbuch Und Atlas Der Allgemeinen Und Speziellen Zytodiagnostik. Karger Publishers 2002, S. 70.

KUBORI T, HYAKUTAKE A, NAGAI H (2008) *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. Mol Microbiol. 2008 Mar;67(6):1307-19

LA SCOLA B, BIRTLES RJ, GREUB G, HARRISON TJ, RATCLIFF RM, RAOULT D (2004) *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 699–703

LAGUNA RK, CREASEY EA, LI Z, VALTZ N, ISBERG RR (2006) A Legionella pneumophila-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 5;103(49):18745-50

LILES MR, EDELSTEIN PH, CIANCOTTO NP (1999) The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* 31:959–970

LO PRESTI F, RIFFARD S, NEYRET C, CELARD M, VANDENESCH F, ETIENNE J (1998) First isolation in Europe of Legionella feeleii from two cases of pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 17(1):64-66

LUKASHIN AV, BORODOVSKY M (1998) GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res.*, 26, 1107-1115.

MINISTRY OF HEALTH (2011) The Prevention of Legionellosis in New Zealand. Wellington: Ministry of Health.

NCBI: ACUL000000000.2. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?&val=ACUL02&size=50&display=contig&page=5#list>, verfügbar am 20.06.2013

NCBI: AE017354.1. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/52627367>, verfügbar am 20.06.2013

NCBI: AREN000000000.1. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=AREN01#contigs>, verfügbar am 20.06.2013

NCBI: BLAST. URL: <http://www.youtube.com/playlist?list=PLH-TjWpFfWrtzMCIvUe-YbrlleFQIKMq>, verfügbar am 10.07.2013

NCBI, CANP000000000.1. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=CANP01>, verfügbar am 20.06.2013

NCBI: L.P. PHIL.: *Legionella pneumophila Philadelphia 1* Taxonomy ID 272624. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=272624&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>, verfügbar am 10.07.2013

NCBI: L.P. PHIL. GENOMSEQUENZ. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/52840256>, verfügbar am 13.08.2013

NCBI:TAXONOMY BROWSER – FAMILY LEGIONELLACEAE. URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=444&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>, verfügbar am 10.07.2013

NEUWALD AF, LIU JS, LAWRENCE CE (1995) Gibbs motif sampling: detection of bacterial outer membrane protein repeats. *Protein Sci.*, 4, 1618-1632.

NEWTON HJ, ANG DK, VAN DRIEL IR, HARTLAND EL (2012) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Apr;23(2):274-98

PAGEL P (2005) GENOMSEQUENZIERUNG FÜR ANFÄNGER. URL:

<http://webclu.bio.wzw.tum.de/binf/edu/tutorials/genomsequenzierung.pdf>, verfügbar am 20.07.2011

PEDRO-BOTET ML, SABRIA-LEAL M, SOPENA N ET AL. (1998) Role of immunosuppression in the evolution of Legionnaires' disease. *Clin Infect Dis* 26:14–19

PLEISCHL S (2004) Zum Vorkommen von Legionellen in wasserführenden, technischen Systemen und der Wirksamkeit von Sanierungsmaßnahmen unter Praxisbedingungen. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

PLEISCHL S (Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn) Legionellen. URL:

http://www.bsafb.de/fileadmin/downloads/baet3/pleischl_legionellen.pdf, verfügbar am 17.01.2013

RIBOLDI-TUNNICLIFFE A, KONIG B, JESSEN S, WEISS MS, RAHFELD, J, HACKER J, FISCHER G, HILGENFELD R (2001) Crystal structure of Mip, a prolylisomerase from *Legionella pneumophila*. *Nat.Struct.Biol.* 8: 779-783

RIDENOUR DA, CIRILLO SL, FENG S, SAMRAKANDI MM, CIRILLO JD (2003) Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion. *Infect Immun.* 2003 Nov;71(11):6256-63

RKI BERLIN – Aquacentrum. URL: <http://www.aquacentrum.de/fostac/FlexClean-Antibiofilm-Duschklauch.html>, verfügbar am 09.07.2013

RKI: INFEKTIONSEPIDEMIOLOGISCHES JAHRBUCH 2012. URL:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2012.pdf?__blob=publicationFile, verfügbar am 28.06.2013

RKI: LEGIONÄRSKRANKHEIT 2011. Epidemiologisches Bulletin 17.12.2012/Nr.50. URL:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2012/Ausgaben/50_12.pdf?__blob=publicationFile

RKI: LEGIONELLOSE (2013) Ratgeber für Ärzte. URL:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Legionellose.html#Start, verfügbar am 08.07.13

ROSSIER O, CIANCOTTO NP (2001) Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. Infect Immun 69:2092–2098

ROWBOTHAM TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J. Clin. Pathol. 33: 1179-1183

SCHREFF AM, SCHINDLER P (2013) Legionellen. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. URL:
<http://www.lgl.bayern.de/gesundheits/hygiene/wasser/legionellen.htm>, verfügbar am 08.07.13

SHOHDY N, EFE JA, EMR SD, SHUMAN HA (2005) Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 29;102(13):4866-71

STANKE, JULIANE (2005) Untersuchung zur Besiedlung der Warmwassersysteme von Ein- und Zweifamilienhäusern mit Legionellen. URL: http://miami.uni-muenster.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-2781/diss_stanke_juliane.pdf, verfügbar am 08.07.2013

STATISTISCHES BUNDESAMT: Polizeilich erfasste Unfälle. URL:
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/TransportVerkehr/Verkehrsunfaelle/Tabellen/UnfaelleVerunglueckte.html?nn=50922>, verfügbar am 28.06.2013

STEINERT M, EMODY L, AMANN R, HACKER J (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* Philadelphia JR 32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2047-2053

TANABE M, NAKAJIMA H, NAKAMURA A, ITO T, NAKAMURA M, SHIMONO T, WADA H, SHIMPO H, NOBORI T, ITO M (2009) Mycotic Aortic Aneurysm Associated with *Legionella anisa*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Vol. 47, No. 7: 2340–2343

THORAKALE AORTENANEURYSMEN. URL:

www.herz.at/therapien/Aneurysmen/aneurysmen_1.htm, verfügbar am 19.07.2013

TRINKWV 2001: "Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. November 2011 (BGBl. I S. 2370), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 5. Dezember 2012 (BGBl. I S. 2562) geändert worden ist". URL: http://www.gesetze-im-internet.de/trinkwv_2001/BJNR095910001.html#BJNR095910001BJNG000201310, verfügbar am 05.07.2013

TU BRAUNSCHWEIG (2008) Legionella. URL: [https://www.tu-](https://www.tu-braunschweig.de/ifm/abt/msteinert/groups/legmip)

[braunschweig.de/ifm/abt/msteinert/groups/legmip](https://www.tu-braunschweig.de/ifm/abt/msteinert/groups/legmip), verfügbar am 27.07.2013

UNBEKANNTER VERFASSER: GENOMSEQUENZIERUNG UND GENOMKARTIERUNG. URL:

<http://genomics.i-med.ac.at/teaching/docs/7.-8.%20Doppelstunde.pdf>, verfügbar am 20.07.2011

VAN DOMSELAAR GH, STOTHARD P, SHRIVASTAVA S, CRUZ JA, GUO A, DONG X, LU P, SZAFRON D, GREINER R, WISHART DS (2005) BASys: a web server for automated bacterial genome annotation. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server issue), W455-9.

VERMA UK, BRENNER DJ, THACKER WL, BENSON RF, VESEY G, KURTZ JB, DENNIS PJ, STEIGERWALT AG, ROBINSON JS, MOSS CW (1992) *Legionella shakespearei* sp. nov., isolated from cooling tower water. *Int J Syst Bacteriol*. 42(3):404-7.

VON BAUM H, HÄRTER G, ESSIG A, LÜCK C, GONSER T, EMBACHER A, BROCKMANN S (2012) Preliminary report: outbreak of Legionnaires disease in the cities of Ulm and Neu-Ulm in Germany, December 2009–January 2010. *Euro Surveill*; 15 (4): 19472

WASSERLEXIKON: DIN 2000. URL: <http://www.wasser-lexikon.de/din-2000/>, verfügbar am 16.01.2013

WEBER SS, RAGAZ C, HILBI H (2009) The inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL1 restricts intracellular growth of *Legionella*, localizes to the replicative vacuole and binds to the bacterial effector LpnE. *Cell Microbiol*. 2009 Mar;11(3):442-60

WILLARD L, RANJAN A, ZHANG H, MONZAVI H, BOYKO RF, SYKES BD, WISHART DS (2003) VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3316–3319.

YANG G, BENSON RF, RATCLIFF RM, BROWN EW, STEIGERWALT AG, THACKER WL, DANESHVAR MI, MOREY RE, SAITO A, FIELDS BS (2012) *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 2):284-8

YU VL, PLOUFFE JF, PASTORIS MC, STOUT JE, SCHOUSBOE M, ET AL. (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* 186: 127–128.

Anlagen

Teil 1

EMPFEHLUNG

23. August 2012



Systemische Untersuchungen von Trinkwasser-Installationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung

Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission

Probennahme, Untersuchungsgang und Angabe des Ergebnisses

1 Anlass

Die geänderte Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001)¹ enthält für *Legionella spec.* einen technischen Maßnahmenwert von 100 KBE/100 ml. Sie schreibt für die Untersuchung von Legionellen in Trinkwasser-Installationen von Gebäuden, in denen eine Großanlage zur Trinkwassererwärmung vorhanden ist, sofern sie Trinkwasser im Rahmen einer gewerblichen oder öffentlichen Tätigkeit abgeben und sich Duschen oder andere Einrichtungen zur Vernebelung des Trinkwassers befinden, eine systemische Untersuchung (siehe Begriffsbestimmung) vor. Die Probennahme muss dabei gemäß DIN EN ISO 19458², Tabelle 1, Zweck b) durchgeführt werden. Damit ist die Empfehlung des Umweltbundesamtes aus dem Jahr 2000³ in einigen Details nicht mehr aktuell. Diese neue Empfehlung des Umweltbundesamtes dient daher der Klarstellung und gibt Hinweise zur Umsetzung der Vorgaben von Trinkwasserverordnung und allgemein anerkannten Regeln der Technik bezüglich der Legionellenuntersuchung. Die Empfehlung des Umweltbundesamtes aus dem Jahr 2000 wird hiermit zurückgezogen.

Diese Empfehlung richtet sich an alle, die in die Untersuchung von Trinkwasser-Installationen in Gebäuden auf Legionellen einbezogen sind, insbesondere an die Unternehmer und die sonstigen Inhaber solcher Anlagen, an Labore und Probennehmer sowie an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter von Gesundheitsämtern.

2 Begriffsbestimmung

2.1 Systemische Untersuchung

Die systemische Untersuchung gemäß § 14 Abs. 3 der TrinkwV 2001 entspricht einer orientierenden Untersuchung wie sie im DVGW-Arbeitsblatt W 551⁴ beschrieben wird. Der Begriff „systemisch“ verdeutlicht, dass es nicht um die Feststellung der Legionellenfreiheit an allen einzelnen Entnahmestellen geht, sondern um eine Stichprobe zur Feststellung einer möglichen Kontamination mit Legionellen in Teilen der Trinkwasser-Installation, die einen Einfluss auf eine größere Anzahl an Entnahmestellen haben kann, insbesondere in den zentralen Teilen der Trinkwasser-Installation wie Trinkwassererwärmungsanlage, Verteilern, Steigsträngen oder Zirkulationsleitungen.

23. August 2012

2.2 Lokale Kontamination

Eine lokale Kontamination bezieht sich auf eine Verkeimung einer einzelnen Entnahmearmatur mit Legionellen (z. B. einen Duschkopf oder einen Duschschlauch) oder eines begrenzten Teils der Trinkwasser-Installation (Endstränge, wie z. B. ein einzelnes Bad in einem Hotel oder Stockwerksleitungen, die nicht in die Zirkulation eingebunden sind). Der Einfluss einer lokalen Kontamination auf benachbarte Entnahmearmaturen oder Teile der Trinkwasser-Installation ist begrenzt.

2.3 Gefährdungsanalyse

Der Begriff „Gefährdungsanalyse“ findet sich in § 9 Abs. 8 Trinkwasserverordnung ohne Definition. Laut DVGW-Hinweis W 1001⁵ versteht man unter diesem Begriff die „systematische Ermittlung von Gefährdungen und Ereignissen in den Prozessen der Wasserversorgung.“ Die Beschreibung der Gefährdungsanalyse in W 1001 bezieht sich zwar nicht auf Trinkwasser-Installationen in Gebäuden, kann aber im o. g. Sinn im Prinzip auch auf diese angewandt werden. Bei Legionellenkontaminationen, insb. wenn sie den technischen Maßnahmenwert überschreiten, soll die Gefährdungsanalyse die Mängel identifizieren, die diese Kontamination ermöglichen. Eine nähere Definition der Gefährdungsanalyse sowie eine Empfehlung zum Vorgehen bei der Umsetzung der Vorgaben der Trinkwasserverordnung zu Legionellen wird zu einem späteren Zeitpunkt separat veröffentlicht werden.

3 Geltungsbereich

Diese Empfehlung gilt für systemische Untersuchungen von Trinkwasser-Installationen gemäß Trinkwasserverordnung. Untersuchungen zur Feststellung von lokalen Kontaminationen sind nicht Gegenstand dieser Empfehlung. Auch weitergehende Untersuchungen gemäß DVGW-Arbeitsblatt W 551 werden in dieser Empfehlung nicht behandelt.

Die Untersuchung von Badebeckenwasser hat gemäß der in Kürze erscheinenden überarbeiteten DIN 19643⁶ zu erfolgen. Auch diese Untersuchungen sind nicht Gegenstand dieser Empfehlung.

Es ist zu unterscheiden zwischen einer systemischen Untersuchung gemäß § 14 Abs. 3 Trinkwasserverordnung und einer Untersuchung zur Feststellung der Trinkwasserqualität an Entnahmestellen „so wie das Wasser verwendet wird“. Für eine systemische Untersuchung wird der Einfluss der Probennahmestelle, wie in DIN EN ISO 19458, Tabelle 1, unter Zweck b) beschrieben, so gering wie möglich gehalten. Die Probe soll die hygienischen Verhältnisse im Verteilungssystem des Gebäudes widerspiegeln.

Ergänzend kann z. B. aus infektionshygienischer Veranlassung auch eine Untersuchung zur Feststellung der Trinkwasserqualität an Entnahmestellen „so wie das Wasser verwendet wird“ notwendig sein. In diesem Fall ist eine Beprobung gemäß DIN EN ISO 19458, Tabelle 1, Zweck c) durchzuführen. Mit dieser Probennahmetechnik können lokale Kontaminationen an der untersuchten Entnahmearmatur festgestellt werden. Die Ergebnisse aus Untersuchungen nach Probennahme gemäß DIN EN ISO 19458, Tabelle 1, Zweck c) können nicht zur Umsetzung der Anforderungen gemäß § 14 Abs. 3 TrinkwV 2001 oder der Anforderungen gemäß DVGW-

23. August 2012

Arbeitsblatt W 551 verwendet oder bewertet werden. Diese Untersuchungen gehen über die systemische Untersuchung hinaus und können über § 19 Absatz 7 oder § 20 der TrinkwV 2001 durch die Gesundheitsämter veranlasst werden oder im Rahmen von weitergehenden Untersuchungen sinnvoll sein (weitere Informationen zur Untersuchung gibt die DVGW-Wasserinformation Nr. 74⁷).

4 Festlegung der Probennahmestellen

Die Probennahmestellen, die für die Durchführung einer systemischen Untersuchung gemäß § 14 Abs. 3 Trinkwasserverordnung notwendig sind, beschreibt das DVGW-Arbeitsblatt W 551 (Abschnitt 9.1 orientierende Untersuchung). In jeder Trinkwasser-Installation sind im Rahmen der systemischen Untersuchung (entspricht einer orientierenden Untersuchung) am Abgang der Leitung für Trinkwasser (warm) vom Trinkwassererwärmer sowie am Wiedereintritt in den Trinkwassererwärmer (Zirkulationsleitung) Proben zu entnehmen. Zusätzlich sind Proben in der Peripherie zu entnehmen. Die Entnahmestellen für die Proben in der Peripherie sollen so gewählt werden, dass jeder Steigstrang erfasst wird. Dies bedeutet nicht, dass Proben aus allen Steigsträngen zu entnehmen sind. Voraussetzung für die Auswahl ist, dass die beprobten Steigstränge eine Aussage über die nicht beprobten Steigstränge zulassen (z. B. weil sie ähnlich/gebaut sind, gleichartige Gebäudebereiche versorgen und gleich genutzt werden oder möglichst hydraulisch ungünstig liegen).

Bei Trinkwasser-Installationen mit vielen Steigsträngen sind primär die Bereiche zu berücksichtigen, in denen das Wasser zum Duschen entnommen wird.

Die Festlegung der Probennahmestellen ist durch hygienisch-technisch kompetentes Personal (z. B. technische Inspektionsstellen, Fachplaner oder Installateurbetriebe) mit nachgewiesener Qualifikation zu treffen. Qualifikationsnachweise sind insbesondere Bescheinigung oder Zertifikat einer Schulung z. B. nach VDI 6023⁸ oder Nachweis einer DVGW-Schulung speziell zu Probenahmen zur systemischen Untersuchung auf Legionellen in Trinkwasser-Installationen. Personen, die bei den genannten Schulungen als Referenten autorisiert sind, sind ebenfalls qualifiziert.

Alternativ können auch alle Steigstränge beprobt werden. Der Unternehmer oder der sonstige Inhaber der Trinkwasser-Installation entscheidet, ob er eine qualifizierte Person mit der Festlegung der zu untersuchenden Steigstränge beauftragt oder ob er alle Steigstränge beproben lässt. Insbesondere bei nur wenigen Steigsträngen kann letzteres einfacher sein. Die Trinkwasserverordnung^a schreibt für eine systemische Untersuchung eine Probennahme gemäß DIN EN ISO 19458, Tabelle 1, Zweck b) vor. Eine Desinfektion der Probennahmearmatur

^a**Hinweis:** Neben den die Legionellen betreffenden Untersuchungspflichten nach Trinkwasserverordnung können sich auch Pflichten aus anderen Rechtsbereichen ergeben, z. B.:

- aus Hygienebestimmungen in Risikobereichen (z. B. Krankenhaushygieneverordnung)
- aus der allgemeinen Verkehrssicherungspflicht (BGB § 823)

23. August 2012

ist erforderlich. Bei der Auswahl von Probennahmearmaturen sind daher abflammbare Ausführungen zu bevorzugen (siehe DIN EN ISO 19458 und VDI 6023 Abschnitt 4.1). Unter der Probennahmearmatur muss genügend Abstand sein, damit Probennahmegefäße ohne Kontakt mit der Probennahmearmatur unter den Auslauf gehalten werden können. Es ist auf einfache Zugänglichkeit, auf Sauberkeit und geeignete Dokumentation der Probennahmestellen zu achten.

Die Entnahmestellen in den peripheren Teilen der Trinkwasser-Installation sollten in Bereichen mit Vernebelung liegen. Da es sich um eine systemische Untersuchung handelt, sollten Entnahmearmaturen oder in Ausnahmefällen Eckventile an nahe gelegenen Waschbecken genutzt werden; eine Probennahme direkt an Duschköpfen ist für diesen Zweck zu vermeiden. Probennahmestellen zur Beprobung der Steigstränge sind an den Stellen mit der längsten Fließstrecke vom Trinkwassererwärmer zu wählen. Die Probennahmestellen sollen so gewählt werden, dass sie möglichst nah am Warmwasserzirkulationssystem angebunden sind bzw. dieses widerspiegeln.

Gemäß § 14 Abs. 3 Trinkwasserverordnung haben der Unternehmer und der sonstige Inhaber von Trinkwasser-Installationen, in denen sich eine Großanlage zur Trinkwassererwärmung befindet, bei gewerblicher oder öffentlicher Tätigkeit Probennahmestellen vorzuhalten, die den allgemein anerkannten Regeln der Technik entsprechen. Die Verpflichtung für Planer, Einrichtungen zur fachgerechten Probennahme vorzusehen, ergibt sich aus dem technischen Regelwerk (z. B. VDI-Richtlinie 6023 und DVGW-Arbeitsblatt W 551) und nicht zuletzt aus § 17 Abs. 1 Satz 3 Trinkwasserverordnung. Probennahmestellen sind in diesem Sinne geeignet, wenn eine Probe gemäß den Anforderungen nach DIN EN ISO 19458 entnommen werden kann.

Darüber hinaus kann das Gesundheitsamt gemäß § 20 Trinkwasserverordnung anordnen, die Proben „an bestimmten Probennahmestellen nach bestimmten technischen Vorgaben zur Durchführung [...] zu entnehmen oder entnehmen zu lassen.“

5 Probennahme

Die Probennahme darf nur durch für die Trinkwasseruntersuchung akkreditierte Labors erfolgen. Diese Labors werden auf Listen der zuständigen obersten Landesbehörden bekannt gemacht. Externe Probennehmer müssen in das Qualitätssicherungssystem des Labors eingebunden sein (siehe ISO 17025 und Erläuterungen dazu in DAkkS 71 SD 4 011⁹). Eine Zertifizierung des Probennehmers allein genügt nicht den Anforderungen der Trinkwasserverordnung. Die Verantwortung für die Durchführung der Probennahme und den Probenransport (Präanalytik) verbleibt ausschließlich bei der Laborleitung des akkreditierten Labors. Der Laborleiter trägt dafür Sorge, dass hinsichtlich der Unabhängigkeit der Durchführung der Probennahme im Sinne der DIN EN ISO/IEC 17025 keine Zweifel bestehen.

Die Trinkwasser-Installation für Trinkwasser warm und, falls erforderlich, die Trinkwasser-Installation für Trinkwasser kalt sind getrennt voneinander zu beproben. Die Beprobung von Mischwasser ist zu vermeiden. Bei Einhebel-Mischbatterien ist dies nicht immer zu gewährleisten. Hier sind ggfs. die Eckventile der nicht zu untersuchenden Zuleitungen vor der

23. August 2012

Probennahme zu schließen. Falls nur Mischwasser für eine Probennahme zur Verfügung steht, ist das auf dem Protokoll der Probennahme zu vermerken.

Die Probennahme erfolgt im Routinebetrieb der Trinkwasser-Installation (normaler Betriebszustand). Die Proben an allen geforderten Probennahmestellen sind am gleichen Kalendertag zu entnehmen. Wenn dies nicht möglich ist, müssen an den anderen Tagen, an denen weitere Proben genommen werden, zumindest die Proben aus den zentralen Teilen der Trinkwasser-Installation am Abgang vom Trinkwassererwärmer und am Wiedereintritt der Zirkulation in den Trinkwassererwärmer erneut entnommen und untersucht werden.

5.1 Schritte der Probennahme (gilt für Trinkwasser warm und kalt):

1. Vorbereitung der Entnahmestelle:
Entfernen von Strahlreglern und anderen Vorrichtungen und Desinfektion der Auslaufstelle der Entnahmearmatur
2. Spülung der Entnahmearmatur:
Öffnen der Entnahmearmatur, Ablauf von 1 Liter Trinkwasser in einen Messbecher und Verwerfen des Wassers
3. Befüllen des Probenbehälters:
Direkt anschließend (ohne Schließen und erneutes Wiederöffnen der Entnahmearmatur) Trinkwasser in einen sterilen Probenbehälter abfüllen und diesen verschließen
4. Messung der Temperatur bei der Probennahme:
Direkt anschließend weitere ca. 250 ml Trinkwasser in einen Messbecher abfüllen und die Wassertemperatur („Probennahmetemperatur“) unverzüglich messen und dokumentieren
5. Messung der Wassertemperatur bei Temperaturkonstanz:
Trinkwasser aus der Entnahmearmatur bis zur Temperaturkonstanz in einen Messbecher ablaufen lassen und in dem Messbecher die Wassertemperatur messen. Die Temperatur ist ebenfalls zu dokumentieren („Konstante Temperatur“)

5.2 Dokumentation

Die Probennahme ist zu dokumentieren und in den Prüfbericht aufzunehmen. Folgende Angaben sollen zusätzlich zu den nach DIN EN ISO 17025¹⁰ geforderten enthalten sein:

- Name und Art des Gebäudes (z. B. Krankenhaus, Sporteinrichtung, Pflegeeinrichtung, Wohngebäude, vermietete Betriebsstätte)
- Bezeichnung des Gebäudeteils (z. B. Bauabschnitt, Stockwerk / Etage, Funktionsbereich und Raum)
- Lokale Lage der Entnahmestelle (z. B. Strang, Verteiler, Waschtisch, Spüle, Wanne, Dusche)
- Art der Entnahmestelle (z. B. Entleerungsventil, Kugelhähne, Einhebel-Mischarmatur, Zweigriff-Mischarmatur, Armatur mit Verbrühungsschutz)
- Angaben zum Trinkwasser (z. B. erwärmtes Trinkwasser, gemischtes Trinkwasser, kaltes Trinkwasser)

23. August 2012

- Ggf. betriebstechnische Besonderheiten während der Probennahme, wie z. B. der Ausfall oder die Zeitsteuerung der Zirkulationspumpe oder Primärenergie

5.3 Transport und Lagerung

Zum Transport und zur Lagerung der Proben enthalten sowohl DIN EN ISO 19458 als auch ISO 11731¹¹ und DIN EN ISO 11731-2¹² Angaben. Gemäß ISO 11731 und DIN EN ISO 11731-2 sind Proben so schnell wie möglich dem Labor zu übergeben, vorzugsweise innerhalb eines Tages, jedoch nicht später als nach zwei Tagen. Die Proben sind während des Transportes lichtgeschützt und gekühlt bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ aufzubewahren. Wird die Probe am selben Arbeitstag untersucht, können die Proben lichtgeschützt und bei Umgebungstemperatur transportiert werden. Heiße Wasserproben sollten direkt nach der Probennahme abgekühlt werden. In der Regel sollte die mikrobiologische Untersuchung so bald wie möglich nach Ankunft im Labor begonnen werden, vorzugsweise am Tag der Probennahme.

Weitere Hinweise zur Probennahme finden sich in einer DVGW twin¹³ sowie in der DVGW-Wasser-Information Nr. 74

6 Untersuchungsgang

Die Untersuchung erfolgt gemäß § 15 Abs. 4 Trinkwasserverordnung durch akkreditierte und von den zuständigen Landesbehörden gelistete Laboratorien. Die Trinkwasserverordnung schreibt als Untersuchungsmethode ISO 11731 sowie DIN EN ISO 11731-2 vor. Als Mindestumfang werden bei der Untersuchung einer Trinkwasserprobe die Membranfiltration von 100 ml sowie der Direktausstrich von zweimal je 0,5 ml angesehen. Darüber hinaus kann die Untersuchung weiterer Probenvolumina (z. B. 10 ml oder 1 Liter) sinnvoll sein, wenn die Größenordnung einer möglichen Kontamination nicht einschätzbar ist.

Es wird nur der Ansatz der Membranfiltration gemäß DIN EN ISO 11731-2 mit Säure behandelt. Eine Behandlung der Direktansätze mit Säure oder Hitze ist nicht zulässig.

7 Angabe der Ergebnisse

Die Koloniezahlen der beiden Direktansätze von je 0,5 ml Probe werden addiert, die Summe mit 100 multipliziert und als KBE pro 100 ml angegeben.

Beispiel: Eine Platte aus dem Direktansatz enthält 3 Kolonien, die zweite Platte aus dem Direktansatz enthält eine Kolonie. Ergebnis: 1 ml Probe enthalten 4 Kolonien; es wurden 400 KBE pro 100 ml gefunden.

Bei Membranfiltrationen wird die Ergebnisangabe auf das filtrierte Probenvolumen bezogen, wobei alle auswertbaren Ansätze (siehe unten) mit einbezogen werden.

Beispiel: Platte nach Filtration von 10 ml Probe enthält 7 Kolonien, Platte nach Filtration von 100 ml enthält 115 Kolonien. Ergebnis: 110 ml Probe enthalten die Summe von 122 Kolonien; es wurden 111 KBE pro 100 ml gefunden.

23. August 2012

Wenn sowohl der Direktansatz als auch Ansätze nach Membranfiltration auswertbar sind, wird nach getrennter Berechnung des Ergebnisses für die Direktansätze und des Ergebnisses für die Filtrationsansätze der höhere Wert allein als Endergebnis angegeben.

Das Endergebnis wird bezogen auf 100 ml Untersuchungsvolumen angegeben. Zusätzlich wird angegeben, aus welchem Ansatzvolumen (1 ml oder 100 ml) das Endergebnis bestimmt wurde. Zwischenergebnisse werden in Prüfberichten nicht dokumentiert.

Wenn weder auf den Platten nach Direktansatz noch auf den Platten nach Membranfiltration Legionellen nachgewiesen werden, ist als Ergebnis „nicht nachgewiesen (n.n.) in 100 ml“ anzugeben. Gemäß DIN EN ISO 8199¹⁴ sind auch Angaben wie „<1 KBE pro 100 ml“ oder „0 KBE pro 100 ml“ zulässig.

Um ein quantitatives Ergebnis anzugeben, können nur Platten ausgewertet werden, die maximal 200 Kolonien aufweisen. Außerhalb dieses auswertbaren Zählbereiches wird der statistische Fehler so groß, dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht mehr gewährleistet ist (siehe auch DIN EN ISO 8199).

Wenn mehr als 200 Kolonien auf einer Platte gezählt werden, ist vorzugsweise, soweit vorhanden, ein Ergebnis aus einem anderen Ansatz mit geringerem Probenvolumen anzugeben. Wenn ein solches zählbares Ergebnis nicht vorliegt, wird das Ergebnis als >200 KBE pro Probenvolumen angegeben.

Begleitorganismen können das Zählergebnis verfälschen oder das Wachstum von Legionellen vollständig verhindern. Ergebnisse, die unter Einbeziehung von Platten, die Begleitorganismen aufweisen, erzielt wurden, sind daher mit einer Unsicherheit behaftet. Wenn möglich ist auf die Einbeziehung von Platten mit starker Kontamination durch Begleitorganismen (mehr Begleitorganismen als Legionellen) zur Berechnung des Ergebnisses zu verzichten. Wenn nur Platten zur Auswertung vorliegen, die starke Kontamination durch Begleitorganismen aufweisen, ist die Untersuchung zu wiederholen. Ist eine Wiederholung unmöglich oder ist auch bei wiederholter Durchführung der Probenahme keine Platte zu erhalten, die frei von Begleitorganismen ist, dann muss dieser Umstand im Prüfbericht angegeben werden. Die Ursache für die Kontamination ist dann zu klären.

¹⁴Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001 (BGBl. I S. 959) in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. November 2011 (BGBl. I S. 2370)

²DIN EN ISO 19458: Wasserbeschaffenheit - Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen, Beuth-Verlag, Berlin

³Empfehlung des Umweltbundesamtes: Nachweis von Legionellen in Trinkwasser und Badebeckenwasser, Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 2000, 43:911-915

⁴DVGW-Arbeitsblatt W 551: Trinkwassererwärmungs- und Trinkwasserleitungsanlagen - Technische Maßnahmen zur Verminderung des Legionellenwachstums - Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasser-Installationen, Beuth-Verlag, Berlin

23. August 2012

⁵ DVGW Technische Mitteilung – Hinweis W 1001: Sicherheit in der Trinkwasserversorgung – Risikomanagement im Normalbetrieb, Beuth-Verlag, Berlin

⁶ DIN 19643: Aufbereitung von Schwimm- und Badebeckenwasser, Beuth-Verlag, Berlin

⁷ DVGW-Wasserinformation Nr. 74: Hinweise zur Durchführung von Probennahmen aus der Trinkwasser-Installation für die Untersuchung auf Legionellen, DVGW, Bonn

⁸ VDI-Richtlinie 6023: Hygiene in Trinkwasser-Installationen - Anforderungen an Planung, Ausführung, Betrieb und Instandhaltung, Beuth-Verlag, Berlin

⁹ DAkkS 71 SD 4 011: Anforderungen bei der Akkreditierung von Trinkwasserlaboratorien. DAkkS GmbH, Berlin

¹⁰ DIN EN ISO 17025: Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien, Beuth-Verlag, Berlin

¹¹ ISO 11731: Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Legionellen, Beuth-Verlag, Berlin



















¹² DIN EN ISO 11731-2: Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Legionellen - Teil 2: Direktes Membranfiltrationsverfahren mit niedriger Bakterienzahl, Beuth-Verlag, Berlin

¹³ DVGW twin Nr. 6: Durchführung der Probennahme zur Untersuchung des Trinkwassers auf Legionellen (ergänzende systemische Untersuchung von Trinkwasser-Installationen), DVGW, Bonn

¹⁴ DIN EN ISO 8199: Wasserbeschaffenheit - Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren, Beuth-Verlag, Berlin

Teil 2

Tabelle 16: Von BASys bestimmte Genfunktionen

Funktion	Gruppe	Farbe	Buchstabe
Translation, ribosomale Struktur und Biogenese	Informationsspeicherung und -verarbeitung		J
Transkription	Informationsspeicherung und -verarbeitung		K
DNA Replikation, Rekombination und Reparatur	Informationsspeicherung und -verarbeitung		L
Zellteilung und Chromosomenaufteilung	Zellulare Prozesse		D
Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperons	Zellulare Prozesse		O
Zellhüllenbiogenese, Außenmembran	Zellulare Prozesse		M
Zellbeweglichkeit und -ausscheidung	Zellulare Prozesse		N
Anorganischer Ionentransport und -metabolismus	Zellulare Prozesse		P
Signaltransduktionsmechanismen	Zellulare Prozesse		T
Energieproduktion und -umsetzung	Metabolismus		C
Kohlenhydrattransport und -metabolismus	Metabolismus		G
Aminosäuretransport und -metabolismus	Metabolismus		E
Nukleotidtransport und -metabolismus	Metabolismus		F
Coenzymmetabolismus	Metabolismus		H
Lipidmetabolismus	Metabolismus		I
Sekundärmetabolitbiosynthese, Transport und Katabolismus	Metabolismus		Q
nur generelle Funktionsvorhersage	ungenau charakterisierte Funktionen		R
Funktion unbekannt	ungenau charakterisierte Funktionen		S

Teil 3

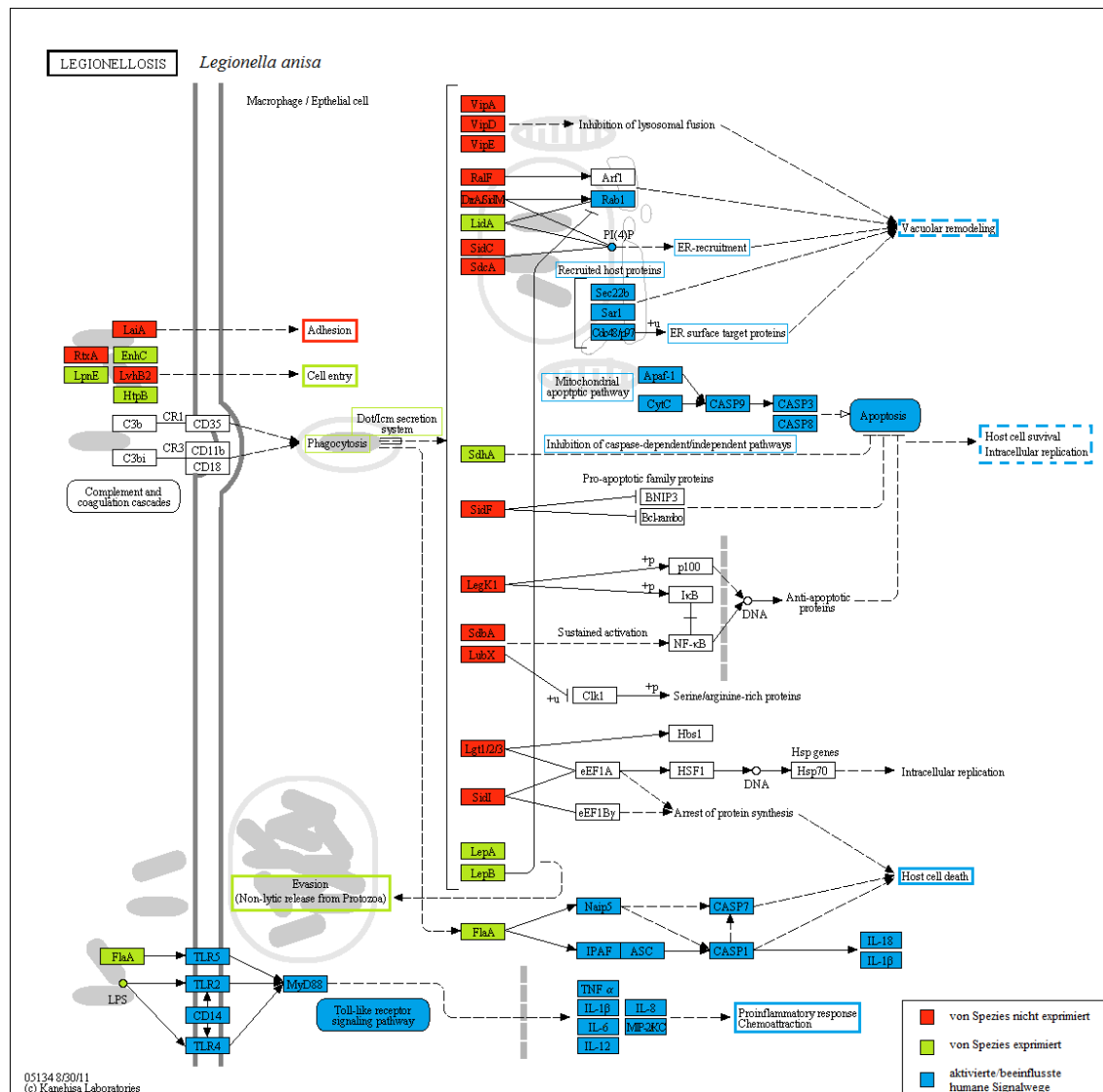


Abbildung 28: Legionellose-Pathway von *Legionella anisa*

Die farbigen Hervorhebungen in der KEGG Legionellose-Karte beruhen auf den BLASTP Ergebnissen. Rot gekennzeichnete Proteine wurden dabei nicht identifiziert und werden demzufolge wahrscheinlich nicht von *L. anisa* exprimiert. Grüne Proteine stellen das Gegenteil dar. Bei den blauen Proteinen/Pathways handelt es sich um humane Proteine/Pathway, welche durch *L. anisa* aktiviert bzw. beeinflusst werden.

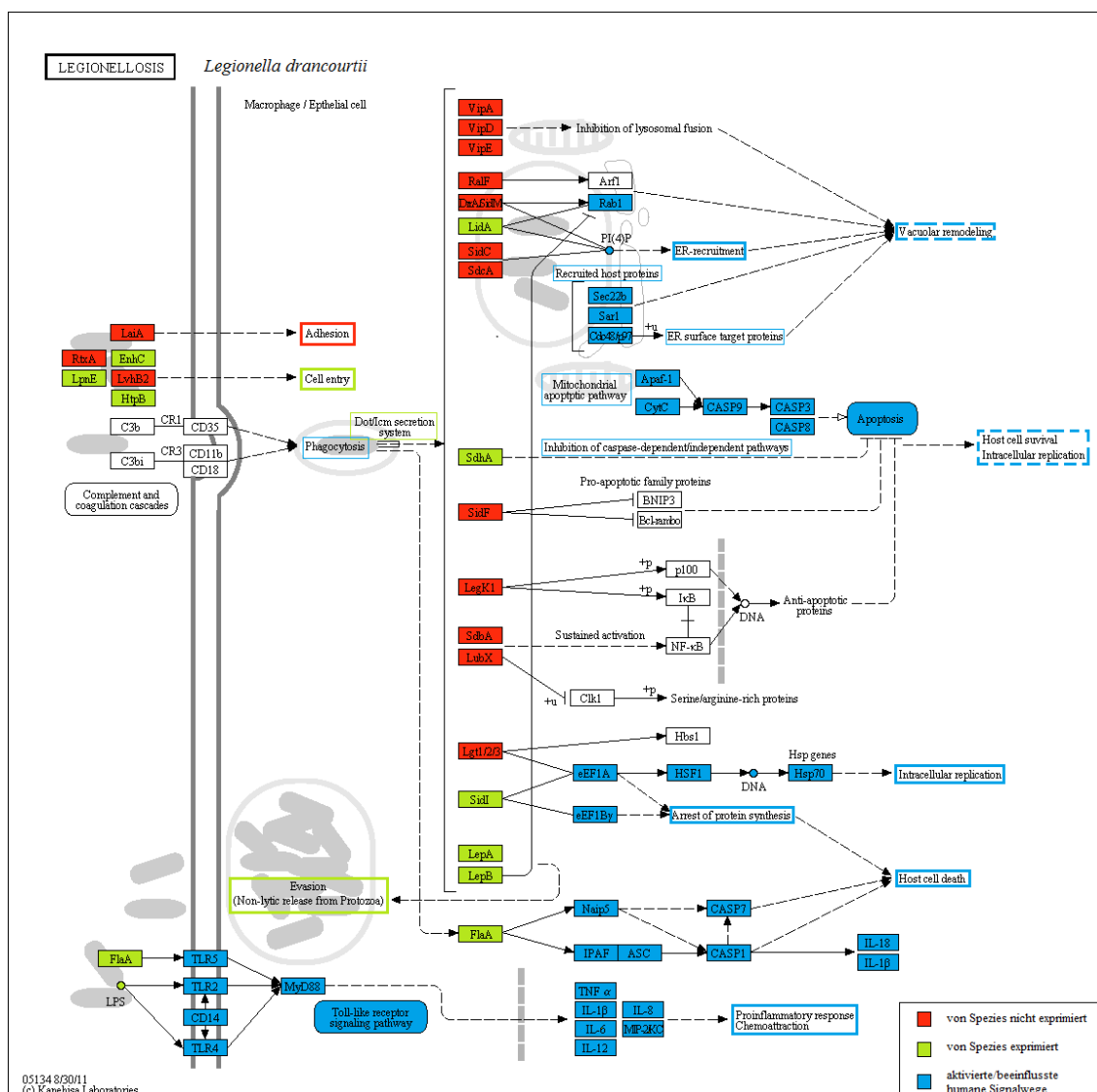
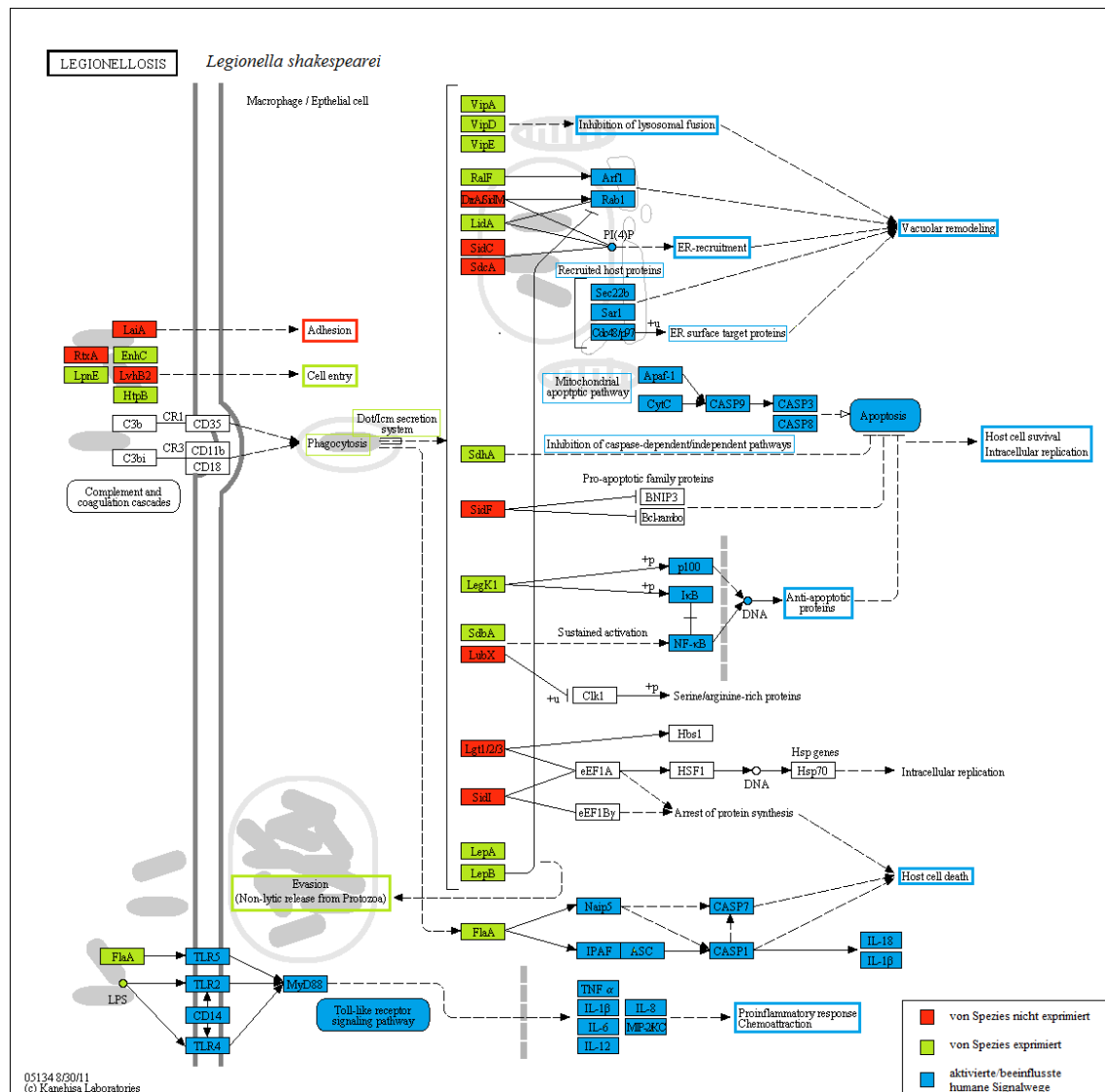


Abbildung 29: Legionellose-Pathway von *Legionella drancourtii*

Die farbigen Hervorhebungen in der KEGG Legionellose-Karte beruhen auf den BLASTP Ergebnissen. Rot gekennzeichnete Proteine wurden dabei nicht identifiziert und werden demzufolge wahrscheinlich nicht von *L. drancourtii* exprimiert. Grüne Proteine stellen das Gegenteil dar. Bei den blauen Proteinen/Pathways handelt es sich um humane Proteine/Pathway, welche durch *L. drancourtii* aktiviert bzw. beeinflusst werden.



Inhaltsangabe der CD-ROM

Auf der CD-ROM sind neben der Masterarbeit als PDF-Datei ein Ordner mit allen Abbildungen und Tabellen der Arbeit, ein Ordner für die Quellen und zwei Ordner mit den Materialien und den Ergebnissen enthalten. Die im Ordner *Ergebnisse* lokalisierten BASys Ergebnisse enthalten alle die Dateien *index.html* und *table.html*, die FASTA Dateien aller Gene und Proteine, eine Genbank Datei, sowie die Ordner *html* und *maps*. Die *index.html* beinhaltet den Startbildschirm der übermittelten BASys Ergebnisse. Dort befinden sich Links zu den Genomkarten und zur Gentabelle. Der Ordner *maps* enthält alle Genomkarten in den verschiedenen Zoomfaktoren als HTML- und PNG-Dateien. Im Ordner *html* sind alle Genkarten der annotierten Gene zu finden. Die Datei *table.html* bietet sofortigen Zugriff auf die Tabelle der annotierten Gene. Des Weiteren befinden sich im Ordner *Ergebnisse* alle GeneMark Ergebnisse, die BLASTP Sequenzalignments und separat alle BASys Genkarten der durch BLASTP identifizierten Schlüsselproteine sowie die modifizierten Legionellose Pathways. Im Ordner *Materialien* sind alle verwendeten Genomsequenzen sowie die Proteinsequenzen der Schlüsselproteine von *L. pneumophila* Philadelphia 1 enthalten. Der Ordner *Quellen* beinhaltet alle zur Verfügung stehenden Paper, die als Quellen angegeben wurden.

CD-ROM

- \ Abbildungen und Tabellen
 - \ Abbildung 1.jpg
 - :
 - :
 - \ Abbildung 30.jpg
 - \ Tabelle 1.jpg
 - :
 - :
 - \ Tabelle 16.jpg
- \ Ergebnisse
 - \ BASys
 - \ Legionella anisa str. Linanisetite
 - \ ...
 - \ Legionella drancourtii str. LLAP12
 - \ ...
 - \ Legionella shakespearei DSM 23087
 - \ ...
 - \ BLASTP
 - \ Alignments
 - \ ...
 - \ BASys Genkarten
 - \ ...
 - \ Legionellose Pathways
 - \ ...
- \ Masterarbeit
 - \ Masterarbeit.pdf
- \ Materialien
 - \ Genomsequenzen
 - \ ...
 - \ Proteinsequenzen
 - \ ...
- \ Quellen
 - \ ...
- \ CD-ROM Beschreibung.txt

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Bearbeitungsort, Datum

Unterschrift